

UNIVERSITÉ DE NANCY

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année 1972-73

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

FRANÇOIS MORTIER

TITRE DE LA THESE :

DE L'INTERET THERAPEUTIQUE DE CERTAINS ACIDES
ORGANIQUEs ALIPHATIQUES CONSTITUANTS DE
DIVERSES DROGUES A REPUTATION HEPATORENALE
ET EN PARTICULIER DE *Cynara scolymus* (L.)

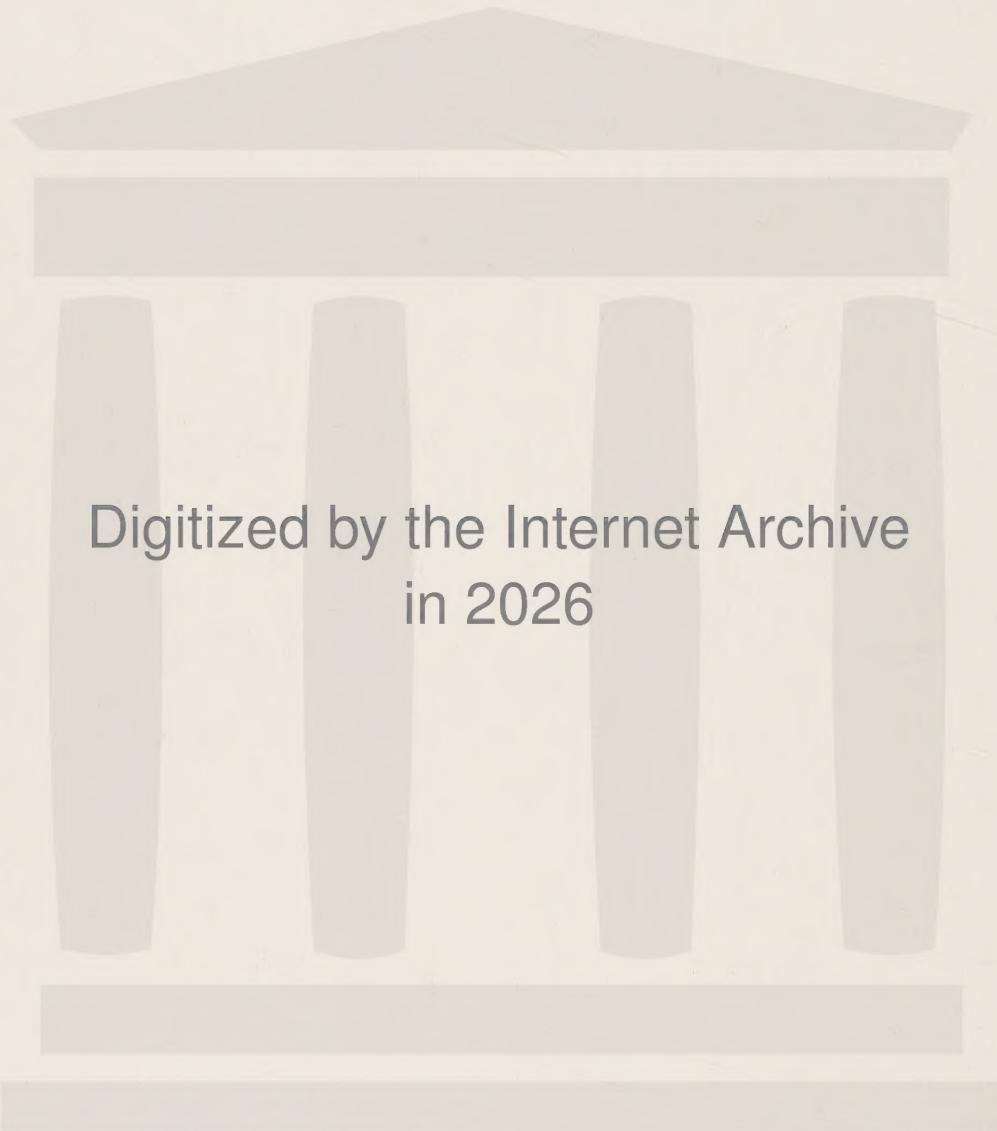
Soutenue le 10 octobre 1972 devant la commission d'examen

Membres du Jury :

Président : M. J.-M. PELT

Juges : Mlle S. BESSON

M. J.-M. JOUANY



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547401_0062

UNIVERSITÉ DE NANCY

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année 1972-73

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

FRANÇOIS MORTIER

TITRE DE LA THESE :

DE L'INTERET THERAPEUTIQUE DE CERTAINS ACIDES
ORGANIQUE ALIPHATIQUES CONSTITUANTS DE
DIVERSES DROGUES A REPUTATION HEPATORENALE
ET EN PARTICULIER DE *Cynara scolymus* (L.)

Soutenue le 10 octobre 1972 devant la commission d'examen

Membres du Jury :

Président : M. J.-M. PELT

Juges : Mlle S. BESSON

M. J.-M. JOUANY

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

FRANÇOIS MORTIER



TITRE DE LA THÈSE :

DE L'INTERET THERAPEUTIQUE DE CERTAINS AGENTS
ORGANISQUES ALIPHATIQUES COMSTITUES DE
DIVERSES DROGUES A REPUTATION HERATOGENALE
ET EN PARTICULIER DE GYNACOLACTONE (1,2)

Soutenue le 10 octobre 1972 devant la commission d'examen.

Membres du Jury :
Président : M. J.-M. PELT
Rapporteur : M. J.-M. PELT
M. J.-M. PELT

UNIVERSITE DE NANCY I

U.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
ET BIOLOGIQUES

ADMINISTRATION

=====

DIRECTEUR

Professeur R. BENE

SECRETAIRE GENERAL

J. MASSON

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Mle	FRANCOIS M. Th.	Matière médicale
MM.	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	SOLEIL J.	Pharmacie chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Mle	BESSION S.	Pharmacodynamie
MM.	BENE R.	Sciences biologiques
	MIRJOLET M.	Chimie analytique et toxicologie
	PIERFITTE M.	Chimie biologique
	PELT J.M.	Biologie végétale et cryptogamie

PROFESSEUR SANS CHAIRE

M.	MARTIN J.A.	Chimie minérale et minéralogie
----	-------------	--------------------------------

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mle	GIRARD Th.	Hygiène
MM.	HAYON J. Cl.	Matière médicale et botanique
	JOUANY J.M.	Toxicologie
	SCHWARTZBROD L.	Microbiologie
	SIEST G.	Chimie biologique
MM.	BONALY R.	Biochimie
	LEMAY R.	Législation et déontologie pharmaceu- tique
	LOPPINET V.	Chimie organique
	VIGNERON C.	Sciences biologiques appliquées à la pharmacie

MAITRES-ASSISTANTS

Mme	LASSEUR A.	Microbiologie
MM.	BAUDOT Ph.	Chimie analytique qualitative
	DIXNEUF P.	Physique
	HOFFMAN M.	Pharmacie galénique
	LECTARD P.	Botanique et cryptogamie
Mme	BALDO S.	Microbiologie
M.	JACQUE M.	Pharmacodynamie
Mle	PANEK E.	Biochimie

CHEF DE TRAVAUX PRATIQUES

M.	AIMOND P.	Chimie analytique quantitative
----	-----------	--------------------------------

ASSISTANTS SUR EMPLOIS DE MAITRE-ASSISTANT

Mle	BARRET F.	Zoologie - Parasitologie
Mme	DILIGENT N.	Chimie biologique
M.	LABRUDE	Pharmacotechnie chimique

DOYENS HONORAIRES : MM. RICHARD G., Recteur de l'Académie de
Montpellier
BERNANOSE A., U.E.R. des Sciences
Pharmaceutiques et biologiques

PROFESSEURS HONORAIRES : MM. CORDEBARD H.
FRANQUET R.

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE : M. ANZIANI P.

A MES PARENTS

En témoignage de ma profonde reconnaissance

A MA FEMME

Je dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection et
de ma reconnaissance pour son aide et sa compréhension

A MES FILS

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur PELT
Professeur de Biologie végétale et de Cryptogamie
à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
de l'Université de NANCY I

A NOS JUGES

Melle le Professeur BESSON
Professeur de Pharmacodynamie

Monsieur le Professeur JOUANY
Professeur de Toxicologie

A MONSIEUR LE DOYEN BENE - DIRECTEUR DE L'U.E.R.
Professeur de Sciences biologiques

A TOUS NOS MAITRES

J'exprime ma profonde reconnaissance à Mademoiselle le Professeur BESSON qui m'a accueilli au certificat de Pharmacodynamie en 1966 et m'a initié à cette discipline grâce à laquelle tout travail de recherche sur les molécules naturelles trouve sa finalité et son intérêt thérapeutique.

J'assure de ma respectueuse gratitude Mademoiselle le Professeur BESSON qui a bien voulu me conseiller et juger ce travail.

Enfin mes remerciements vont aussi à tous mes camarades du laboratoire. C'est dans un réel climat d'amitié et d'échanges intellectuels permanents que j'ai collaboré avec Pierre LECTARD, Michèle LORRAIN, Nicole et René KICHENBRAND, sans oublier Michel JACQUES qui fut de bon conseil en pharmacodynamie et Mireille CHMIDLIN, Jean COLIN et Chantal GINSBURGER dont l'inlassable dévouement me fut d'un grand secours en toutes circonstances notamment pour l'impression de ma thèse

Il m'est agréable de suivre la tradition qui veut que le candidat, avant d'exposer les résultats de ses travaux, exprime à ses Maîtres ses sentiments de gratitude et de reconnaissance. Je tiens à remercier vivement Monsieur le Professeur PELT qui m'a fait découvrir tant de perspectives nouvelles et originales sur la Pharmacognosie moderne, marquant ainsi profondément l'esprit qui a animé le développement de ce travail. Grâce à ses conseils et à son appui amical, il m'a guidé dans ma carrière débutante d'enseignant. L'ambiance fraternelle du Laboratoire de Biologie végétale a toujours été pour moi d'un grand réconfort, me permettant d'entreprendre une carrière scientifique sans les craintes bien naturelles et l'appréhension du jeune chercheur.

Que Monsieur le Professeur PELT veuille bien trouver ici l'expression de ma vive reconnaissance.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent aussi à Monsieur le Professeur JOUANY qui me proposa ce sujet auquel il s'était intéressé de par ses fonctions de conseiller scientifique au Laboratoire ROSA. Monsieur le Professeur JOUANY m'a toujours fait bénéficier de sa très large expérience tant dans le domaine analytique que pharmacologique. Grâce à ses hautes compétences scientifiques, les problèmes qui lui étaient soumis restaient rarement sans réponse.

Je tiens particulièrement à le remercier pour ses encouragements amicaux et ses critiques pertinentes qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

S O M M A I R E

INTRODUCTION

I - Historique	2
II - Composition chimique	3
III - Les acides-alcools de l'Artichaut	6
IV - Les acides-alcools dans les plantes à réputation diurétique	8

1ère PARTIE

ETUDE CHIMIQUE ET ANALYTIQUE DES EXTRAITS D'ARTICHAUT

<u>CHAPITRE I</u> : Extraction des acides organiques, en particulier des acides-alcools naturels chez les plantes à action hépatorénale : application à l'Artichaut.	14
A - Techniques décrites dans la bibliographie	
I - Méthode de ROSENTHALER	14
II - Méthode de PEPKOWITZ	15
III - Méthode par précipitation à l'acétate de plomb	15
B - Techniques personnelles	
I - Extraction après hydrolyse alcaline	17
II - Extraction après hydrolyse acide	19
III - Extraction sans hydrolyse	20
<u>CHAPITRE II</u> : Caractères analytiques qualitatifs des extraits butanoliques de l'Artichaut	21
A - Mise en évidence des acides	22
1) - Réaction de BERG	
2) - Réaction de DENIGES	
3) - Réaction au gaïacol sulfurique	

B - Caractérisation par chromatographie en couche mince	24
I - C.C.M. des composés sous forme acide	24
1) - Conditions opératoires	
2) - Choix des révélateurs	
3) - Application à l'Artichaut	
II - C.C.M. des composés sous forme de sels d'ammonium	34
1) - Conditions opératoires	
2) - Choix des révélateurs	
3) - Application à l'Artichaut	
III - Conclusions	36
C - Identification du composé inconnu de l'Artichaut	40
I - Hypothèse sur la nature de ce composé	40
II - Mise en évidence de la liaison éthylique	41
1) - Technique de préparation	
2) - C.C.M. des composés d'addition	
III - Purification du produit par C.C.M. préparative	43
IV - Caractères analytiques	43
1) - Réactions colorées	
2) - Chromatographie en couche mince	
V - Extraction du motif acrylique à partir de la cynaropicrine	46
1) - Extraction de la cynaropicrine	
2) - Extraction du motif acrylique après hydrolyse de la cynaropicrine	
3) - C.C.M. du motif acrylique : comparaison avec le produit inconnu	
VI - Recherche de l'acide α hydroxyméthylacrylique libre dans l'Artichaut	51
1) - Technique d'extraction	
2) - Chromatographie de l'extrait butanolique	
3) - Discussion et résultats	

VII - Synthèse et caractères physico-chimiques de α hydroxyméthylacrylique ; comparaison avec le corps isolé dans l'extrait d'Ar- tichaut	53
1) - Synthèse de l'H.M.A.	
2) - Caractères physico-chimiques	
3) - Comparaison du composé obtenu syn- thétiquement avec le corps isolé dans l'extrait d'Artichaut	

CHAPITRE III: Caractérisation en chromatographie gazeuse des acides et acides-alcools de l'Artichaut 57

A - Préparation et chromatographie des témoins	57
I - Technique de préparation des dérivés silylés	58
II - Chromatographie gazeuse des témoins	58
1) - Conditions opératoires	
2) - Résultats	
3) - Discussion	
B - Préparation et analyse des échantillons d'Ar- tichaut	64
I - Préparation et chromatographie de l'extrait butanolique d'Artichaut obtenu après hydro- lyse alcaline	64
1) - Conditions opératoires	
2) - Résultats	
3) - Discussion	
4) - Comparaison des résultats obtenus par C.C.M. et G.L.C.	
II - Préparation et chromatographie de l'ex- trait butanolique d'Artichaut obtenu sans hydrolyse préalable	71
1) - Conditions opératoires	
2) - Résultats	
3) - Discussion	
C - Discussion générale des méthodes d'extraction et d'analyse qualitative	72

CHAPITRE IV : Déterminations quantitatives par voie enzymatique 77

A - Techniques utilisées	77
I - Extraction des acides-alcools	77
II - Dosage de la matière organique	77
III - Détermination enzymatique	77
B - Résultats	78
C - Discussion	80

2ème PARTIE

ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES EXTRAITS D'ARTICHAUT	82
--	----

<u>CHAPITRE I</u> : Introduction et rappel historique	83
---	----

<u>CHAPITRE II</u> : Etude des toxicités aigüe et chronique de l'extrait butanolique d'artichaut	85
--	----

A - Toxicité aigüe	85
--------------------	----

I - Préparation de l'échantillon	85
----------------------------------	----

II - Détermination de la D L 50	85
---------------------------------	----

III - Aspect clinique des animaux	86
-----------------------------------	----

B - Toxicité chronique	87
------------------------	----

I - Protocole expérimental	87
----------------------------	----

II - Résultats	88
----------------	----

 1) - Variation de la courbe de prise de poids

 2) - Variation de la numération globulaire

 3) - Variation de la formule sanguine

III - Discussion	93
------------------	----

<u>CHAPITRE III</u> : Rôle détoxifiant vis-à-vis du pentobarbital et de l'alcool éthylique	94
--	----

A - Rappels expérimentaux	94
---------------------------	----

B - Mise en évidence de l'activité détoxicante	95
--	----

I - Diminution de la durée de sommeil induite par le pentobarbital chez la souris	95
---	----

 1) - Protocole expérimental

 2) - Résultats

 3) - Discussion

II - Variations de la D L 50 de l'alcool éthylique chez la souris	99
1) - Protocole expérimental	
2) - Résultats	
3) - Discussion	
 <u>CHAPITRE IV</u> : Mise en évidence des effets ampho- cholérétiques	105
A - Définition et mode d'étude	105
B - Action amphocholérétique d'un extrait d'Artichaut	106
I - Action sur la cholérèse	107
II - Action sur l'hypercholérèse provoquée	107
1) - Protocole opératoire	
2) - Discussion des résultats	
3) - Valeur statistique des résultats	
III - Action sur l'hypocholérèse provoquée	111
1) - Protocole expérimental	
2) - Résultats et discussion	
C - Action amphocholérétique des acides organiques présents dans l'extrait d'Artichaut	112
I - Action sur la cholérèse	114
II - Action sur l'hypercholérèse provoquée	114
1) - Protocole opératoire	
2) } Discussion des résultats	
3) - Valeur statistique des résultats	
III - Action sur l'hypocholérèse provoquée	119
1) - Protocole opératoire	
2) - Discussion des résultats	
D - Variations des divers constituants biliaires	121
I - Valeurs obtenues après hypercholérèse provoquée	122
II - Valeurs obtenues après hypocholérèse provoquée	123
III - Discussion	123

<u>CHAPITRE V</u> : Effets diurétiques	126
A - Principes diurétiques de l'Artichaut	126
B - Etude de la diurèse sur le rat	127
C - Diurèse expérimentale sur le lapin	129
I - Protocole expérimental	129
II - Matériel utilisé	130
III - Résultats	130
1) - Action diurétique d'une solution de bicarbonate de sodium	
2) - Action diurétique des acides et acides-alcools utilisés seuls	
3) - Action diurétique des mélanges d'acides	
IV - Discussion des résultats	139
V - Action diurétique des extraits butanoliques d'Artichaut	146
1) - Préparation des extraits	
2) - Résultats et discussion	
VI - Bilan ionique urinaire	147
1) - Protocole de dosage	
2) - Expression des résultats	
3) - Discussion	

3ème PARTIE

APPLICATIONS DES METHODES ANALYTIQUES ET PHARMACODYNAMIQUES A D'AUTRES DROGUES	151
--	-----

<u>CHAPITRE I</u> : Recherche et dosage des acides et acides alcools dans diverses drogues	153
A - Approche préliminaire	153
B - Sélection d'espèces supposées actives	158
I - Choix des drogues	158
II - Estimation et analyse quantitative	161

<u>CHAPITRE II</u> : Essais pharmacologiques	170
A - Introduction	170
B - Action diurétique	171
I - Préparation des extraits	171
II - Résultats et discussion	171
C - Rôle détoxiquant vis-à-vis du pentobarbital et de l'alcool éthylique	174
I - Diminution de la durée de sommeil induite par le pentobarbital chez la souris	174
1) - Protocole expérimental	
2) - Résultats et discussion	
II - Variations de la D L 50 de l'alcool éthylique chez la souris	177
1) - Protocole expérimental	
2) - Résultats et discussion	
III - Effets amphocholérétiques de divers extraits butanoliques	179
1) - Protocole expérimental	
2) - Résultats et discussion	
CONCLUSIONS	184

I N T R O D U C T I O N

L'ARTICHAUT DANS LA THERAPEUTIQUE

I - HISTORIQUE

Si l'usage du Cynara scolymus (L.) en tant que médicament remonte à la plus haute antiquité, il reste aujourd'hui encore l'une des plantes les plus utilisées en thérapeutique.

L'artichaut était inscrit à la première édition de la Pharmacopée française de 1818 ; puis, tombé dans l'oubli, il réapparaît dans la 8e édition (1965), en raison de l'importance de son utilisation. PARIS et MOYSE (1971) estiment que la consommation française est de l'ordre de 1 000 tonnes de feuilles fraîches et de plusieurs centaines de tonnes de feuilles sèches par an ; l'artichaut se place ainsi au premier rang de nos drogues indigènes.

L'artichaut appartient à la famille des Composées, sous-famille des Tubuliflores. D'origine éthiopienne, il a fait l'objet, comme de nombreuses autres espèces à usage alimentaire d'une lente sélection et gagna peu à peu toute la région méditerranéenne. Ses origines exactes restent problématiques : selon ROCHETTA (1959), l'artichaut ne serait pas une variété spontanée, mais le résultat de l'amélioration d'un chardon sauvage : Cynara cardunculus (L.).

Cynara scolymus (L.) a été décrit par THEOPHRASTE ; on le retrouve dans l'édition de DIOCLETIEN sous le nom de "sphondulos" et chez plusieurs auteurs anciens : STRABON, PLINIE et COLUMELLE.

L'emploi de l'artichaut s'est perdu, comme celui de nombreuses autres drogues, au cours du Moyen-Age. Il réapparaît au XVe siècle en Italie. Amatus LUSITANUS (1551) le prescrit au

Pape Jules III et au Grand Duc de Toscane : Cosme II de Médicis. Introduit en France au XVI^e siècle, il y connaît un grand succès, et au XVIII^e siècle, Pierre Jean Baptiste CHOMEL (1761) recommande l'emploi d'une décoction de feuilles dans l'ictère et l'hydropisie.

Ces deux propriétés thérapeutiques de l'artichaut avaient déjà été entrevues par GALIEN qui considérait aussi cette plante comme apte à provoquer l'élimination des calculs urinaires et à combattre la mauvaise odeur corporelle.

Ses propriétés hépatiques et rénales furent ensuite mises à profit en médecine populaire : on utilise toutes les parties de la plante sous forme d'infusion ou de décoction ; mais il faudra attendre le XIX^e siècle pour voir s'esquisser les premières tentatives de recherche chimique sur Cynara scolymus (L.). En effet, GUITEAU (in Tixier, 1935) prépare un extrait hydro-alcoolique très amer, de couleur brun foncé, ayant l'apparence des extraits de drogue purgative et notamment de l'aloès. Certains auteurs ayant cru mettre en évidence une réaction de BORNTAEGER positive, l'artichaut fut considéré pendant longtemps comme une drogue purgative de type anthraquinonique.

II - COMPOSITION CHIMIQUE

L'étude chimique fut reprise par BREL (1930) qui attribua les propriétés thérapeutiques de l'artichaut à sa richesse en sels organiques. Mais ces travaux n'eurent guère d'écho. En 1931, CHABROL et ses coll. réfutèrent la présence de dérivés anthraquinoniques et attribuèrent l'activité cholérétique à des "composés cycliques à fonctions phénoliques".

C'est en 1954 que PANIZZI et SCARPATI réussirent à isoler le principe actif entrevu par CHABROL. Il s'agissait d'un polyphénol qu'ils identifièrent comme étant l'acide 1-4 dicaféylquinique, dont la structure fut confirmée ensuite par synthèse. Cette substance est en réalité un artefact, le composé primaire serait l'acide 1-3 di-caféylquinique (MICHAUD, 1964).

Cette substance dénommée cynarine révéla de fortes propriétés cholérétiques ; PREZIOZI et LOSCALZO (1957) la considèrent comme responsable de l'activité diurétique et douée d'un effet hypocholestérolémiant.

Les recherches s'orientèrent alors dans cette voie : SCARPATI et coll. (1957) décelèrent la présence de différents polyphénols, parmi lesquels l'acide chlorogénique et les acides caféiques, puis MICHAUD mit en évidence des flavonoïdes dérivés du lutéol : Cynaroside et Scolymoside (MICHAUD, 1964-1967).

Enfin, un principe amer fut identifié par SUCHY et coll. (1960) et dénommé Cynaropicrine.

Des études sur les stéroïdes de Cynara scolymus (L.) furent entreprises par ATHERINOS et coll. (1962) qui conclurent à la présence de Taraxastérol, ψ -Taraxastérol, Sigmastérol et β -Sitostérol. Ces auteurs isolèrent également une sapogénine dérivant d'un trihydroxystéroïde : la Cynarogénine.

Il faut citer enfin la présence de mucilages, de pectines, de tanins, de sucres et de glucosides (BERNARD ET LALLMAND, 1953).

Nous récapitulons dans le tableau T 1 l'ensemble des constituants isolés dans l'artichaut par les auteurs cités.

TAB.(T1) : CONSTITUTION CHIMIQUE DE L'ARTICHAUT

Polyphénoles		Principe	Stéroïdes	Acides organiques Acides-alcools	Sucres	Tanin	Sels minéraux
Dérivés caféiques	Flavonoïdes	amer					
Cynarine			Taraxastérol				
Ac. chlorogénique			ψ Taraxastérol	Malique	Glucose		Na ⁺
Ac. caféique	Scolymoside	Cynaro- picrine	Sigmastérol	Glycolique	Lévulose	Pyrocatechique	K ⁺
Ac. isochlorogénique	Cynaroside		β Sitostérol	Glycérique	Inuline		Mg ⁺⁺
Ac. néochlorogénique			Cynarogénine	Lactique			Ca

III - LES ACIDES-ALCOOLS DE L'ARTICHAUT

C'est BALANSARD J. (1952) qui entreprit le premier l'étude des acides organiques, dont les sels étaient considérés par BREL dès 1930, comme responsables de l'activité thérapeutique de l'artichaut.

Les acides isolés, étaient au nombre de quatre : l'acide malique, l'acide lactique, l'acide glycolique et l'acide glycérique ; ces deux derniers acides présentaient d'ailleurs une certaine activité diurétique, mais comme le précise BALANSARD : "le fait de leur seule présence dans une drogue ne justifiera pas l'emploi de celle-ci comme diurétique. En effet, c'est à partir d'une certaine dose seulement qu'ils seront à même d'agir ; ici le problème quantitatif prend le pas sur la notion de qualité".

Nous orientant vers la recherche de constituants végétaux simples, atoxiques, à comportement de type métabolique et doués de propriétés médicamenteuses, l'artichaut nous a semblé une piste de travail privilégiée ; aussi avons-nous repris l'étude des acides et acides-alcools de cette drogue, en vue de mettre au point une méthode d'extraction, d'identification et de séparation, de définir leurs effets pharmacodynamiques et enfin de comparer l'artichaut à plusieurs groupes de plantes à réputation cholagogue, cholérétique et diurétique, tant du point de vue chimique que pharmacologique. Nous ne sous-estimons pas au départ les risques de l'entreprise, sachant l'extrême difficulté de la chimie analytique, extractive et séparative, de cette série chimique d'acides organiques.

Toutefois, un certain nombre d'indices nous amenaient à penser que ces molécules, bien que d'apparence banale, n'étaient pas dénuées d'activité thérapeutique. Il est en effet frappant de constater que l'extrait purifié de Cynara scolymus (L.), commercialisé sous le nom de Chophytol^{*}, se révélait être actif sur les néphrites chroniques, sur l'oligurie des cardiaques et des cirrhotiques, bien que ne contenant plus de cynarine ni de dérivés flavoniques. Nous pouvions dès lors penser, en rapprochant ce fait des observations de BALANSARD, que les acides organiques présents dans cette préparation étaient en partie du moins responsables de l'activité rénale.

Si l'on peut admettre que la Cynarine est bien le principe chlagogue et cholérétique de Cynara scolymus (L.), on ne peut rapporter l'effet diurétique à cette seule substance. Et pourtant, l'artichaut et ses préparations sont considérés depuis longtemps comme doués d'une action hépatorénale. D'autres principes semblent donc intervenir et peut-être les acides-alcools. Cette hypothèse nous paraissait vraisemblable et trouvait un début de confirmation dans l'observation suivante : si l'on compare la répartition des acides et acides-alcools dans le règne végétal et les espèces utilisées empiriquement comme diurétique, on est frappé de constater que de nombreuses espèces douées de cette réputation renferment précisément des acides malique, succinique, citrique, glycolique et glycérique.

* Lab. Rosa Phytopharma (communication personnelle).

IV - LES ACIDES-ALCOOLS DANS LES PLANTES A REPUTATION DIURETIQUE

C'est ainsi que les drogues à réputation diurétique citées par LECLERC (1966), TROUARD-RIOLLE (1964), FOURNIER (1952), LIEUTAGHUI (1966), GARNIER et coll. (1961) contiennent toutes au moins deux de ces acides, en proportions relativement importantes.

Le tableau T 2 nous en montre la répartition telle qu'elle a pu être établie à partir des ouvrages de MENTZER (1964, 1966, 1968), HEGNAUER (1962, 1969), GARNIER et coll. (1961) et PARIS (1971).

Cette liste n'est évidemment pas limitative ; elle ne représente que les plantes de la flore indigène. Il conviendrait également de prendre en considération diverses espèces importantes d'origine exotique comme : l'Orthosiphon (ROUSSELLET et PARIS, 1971), le Boldo (ROUSSELLET et PARIS, 1971) ou le Kinkeliba (KERHARO, 1970).

Le problème était donc de savoir si cette répartition était une pure coïncidence, d'autant que les acides-alcools sont très répandus dans le monde végétal, ou si au contraire, ils devaient être considérés comme les véritables responsables des réputations diurétiques. C'est un des points que nous nous proposons d'éclaircir au cours de ce travail.

TAB.(12) : REPARTITION DES ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS DANS LES PLANTES REPUTÉES POUR LEUR ACTION HEPATORENALE

PLANTES A REPUTATION DIURETIQUE ET ACTION HEPATORENALE :				ACIDES ALCOOLS				
FAMILLE	ESPECES	Partie employée	Acide glycolique	Acide glycérique	Acide malique	Acide succinique	Acide citrique	
Equisétacées	Prêle <i>Equisetum arvense</i>	Tige	+		+			
Cupressacées	Thuya <i>Thuya occidentalis</i>	Feuilles	+					
Cupressacées	Genévrier <i>Juniperus communis</i>	baie	+					
Betulacées	Bouleau <i>Betula alba</i>	feuilles		+		+		
Urticacées	Pariétaire <i>Parietaria officinalis</i>	plante entière	+					
Légumineuses	Bugrane <i>Ononis spinosa</i>	racine						+
Rosacées	Cerise <i>Prunus cerasus</i>	pédoncule	+		+			+
Rosacées	Ulmair <i>Spiræa Ulmaria</i>	fleurs						
Ombellifères	Ache <i>Apium graveolens</i>	racine	+		+			+
Ombellifères	Fenouil <i>Foeniculum dulce</i>	fruit		+				+
Ombellifères	Persil <i>Petroselinum sativum</i>	fruit		+				+

TAB.(12) : REPARTITION DES ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS DANS LES PLANTES REPUTÉES POUR LEUR ACTION HEPATORENALE

PLANTES A REPUTATION DIURETIQUE ET ACTION HEPATORENALE				ACIDES ALCOOLS						
FAMILLE	ESPECES	Partie	Acide	Acide	Acide	Acide	Acide	Acide	Acide	Acide
		employée	glycolique	glycérique	malique	succinique	citrique			
Ombellifères	Panicaut Eryngium campestre	Racine	+	+						
Ombellifères	Panicaut Eryngium maritimum	Racine	+	+						
Saxifragacées	Cassis Ribes nigrum	feuilles	+		+			+		+
Ericacées	Busserole Arctostaphylos Uva-Ursi	feuilles	+	+				+		+
Ericacées	Bruyère Erica cinerea	plante entière	+		+			+		+
Oleacées	Frêne Fraxinus excelsior	feuilles		+						
Oleacées	Olivier Olea europæa	feuilles	+		+					
Solanacées	Alkékenge Physalis Alkekengi	fruit	+		+			+		+
Caprifoliacées	Sureau Sambucus nigra	fleur écorce	+	+						+
Composées	Artichaut Cynara Scolymus	feuilles	+		+			+		+
Composées	Solidage Solidago Virga-aurea	sommités fleuries racine	+		+			+		+

TAB.(T2) : REPARTITION DES ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS DANS LES PLANTES REPUTÉES POUR LEUR ACTION HEPATORENALE

PLANTES A REPUTATION DIURETIQUE ET ACTION HEPATORENALE			ACIDES ALCOOLS						
FAMILLE	ESPECES	Partie employée	Acide glycolique	Acide glycérique	Acide malique	Acide succinique	Acide citrique		
Composées	Piloselle	Plante							
	Hieracium Pilosella	entière			+	+	+		
Composées	Erigeron		+						
	Erigeron Canadensis				+	+			
Composées	Chicorée	feuilles et							
	Cichorium Intybus	racines	+	+	+	+	+		
Composées	Carlina								
	Carlina acaulis	racines	+		+	+	+		
Composées	Lampsane								
	Lampsana communis	feuilles							
Composées	Cardère								
	Dipsacus fullonum	racine							
Composées	Bardane	racine	+	+	+		+		
	Arctium majus	feuilles							

TAB. (T2) : REPARTITION DES ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS DANS LES PLANTES REPUTÉES POUR LEUR ACTION HEPATORENALE

PLANTES A REPUTATION DIURETIQUE ET ACTION HEPATORENALE			ACIDES ALCOOLS				
FAMILLE	ESPECES	Partie employée	Acide glycolique	Acide glycérique	Acide malique	Acide succinique	Acide citrique
Graminées	Maïs Zea Mays	styles	+	+	+		+
Graminées	Chiendent Agropyrum repens	rhizome	+	+	+		+
Liliacées	Scille Urginea scilla	bulbe	+	+			
Liliacées	Asperge Asparagus officinalis	rhizome racine	+	+	+	+	+
Liliacées	Petit houx Ruscus aculeatus	rhizome racine	+	+			+
Liliacées	Oignon Allium Cepa	bulbe	+	+	+		+

PREMIERE PARTIE

ETUDE CHIMIQUE ET ANALYTIQUE

DES EXTRAITS D'ARTICHAUT

C H A P I T R E I

EXTRACTION DES ACIDES ORGANIQUES, EN PARTICULIER DES ACIDES-ALCOOLS NATURELS CHEZ LES PLANTES A ACTION HEPATORENALE : APPLICATION A L'ARTICHAUT

La chimie analytique des acides-alcools est délicate et s'est heurtée à de nombreuses difficultés.

Différentes méthodes d'extraction, à partir des milieux végétaux, ont été décrites. Dans la première partie de ce chapitre, nous allons les énumérer et essayer de les comparer entre elles. Puis nous proposerons une technique personnelle qui nous a semblé donner de meilleurs résultats.

A - TECHNIQUES DECRITES DANS LA BIBLIOGRAPHIE

I - METHODE DE ROSENTHALER (in BRUNEL, 1952)

L'isolement des acides organiques à partir d'un matériel végétal quelconque nécessite la prise d'essai minimale de 100 g de plantes sèches.

Ces substances végétales sont alors soumises à une série d'extractions successives par des quantités massives d'éther de pétrole, puis d'éther, de chloroforme, d'alcool, d'eau distillée froide et bouillante, d'acide chlorhydrique à froid et à chaud et d'hydroxyde de sodium.

C'est en raison de son extrême complexité que nous indiquons simplement cette méthode à titre de référence.

II - METHODE DE PEPKOWITZ (1944) (PEPKOWITZ et coll.)

Il faut, dans un premier temps, déterminer la quantité exacte d'acide nitrique (4 N) à ajouter à une prise d'essai de 1 g pour l'amener à pH 1. Ensuite, 2 g de substances végétales sèches et pulvérisées sont additionnés de la quantité d'acide nitrique (4 N) calculée d'après l'essai préliminaire. On incorpore à cette préparation 3,5 g d'amiante finement pulvérisée et le tout est placé dans la cartouche d'un SOXLET.

L'extraction est alors effectuée de façon habituelle avec 150 cm³ d'éther exempt de toutes traces d'eau, pendant une vingtaine d'heures. Puis l'extract éthéré est traité par 25 cm³ d'eau bouillie et 2 cm³ d'hydroxyde de sodium (5 N). Après agitation dans une ampoule à décanter, la phase aqueuse est soutirée.

Cette méthode, plus commode que la précédente, a cependant l'inconvénient d'être assez longue et d'entraîner une partie de la chlorophylle et des pigments qui, bien que partiellement éliminés par précipitation à l'aide d'une solution de nitrate d'ammonium, interfèrent lors des techniques d'identification.

III - METHODE PAR PRECIPITATION A L'ACETATE DE PLOMB (BRUNEL, 1952)

Les substances pectidiques sont d'abord précipitées à ébullition, après traitement du matériel végétal en milieu alcoolique. Après filtration et neutralisation de la liqueur, l'addition d'une solution d'acétate neutre de plomb précipite les acides malique, succinique, citrique et tartrique.

Ce précipité est remis en suspension dans l'eau et décomposé par passage d'un courant d'hydrogène sulfuré assurant la séparation des acides de leur combinaison plombique. Le sulfure de plomb est à nouveau éliminé par filtration. A la liqueur ainsi obtenue, concentrée, sont ajoutés du chlorure d'ammonium et du chlorure de calcium assurant la précipitation de l'acide tartrique. L'acide citrique est ensuite précipité par addition d'acétate de baryum. C'est après la dernière filtration que pourront être effectuées les réactions de l'acide malique.

Au filtrat obtenu, dans le tout premier temps, on ajoute de l'acétate basique de plomb et quatre volumes d'alcool à 95°, ce qui entraîne la formation d'un précipité constitué par les combinaisons plombiques des acides glycolique et glycérique.

Ce précipité est remis en suspension dans l'eau puis décomposé par de l'hydrogène sulfuré. Après filtration et évaporation à sec, le résidu obtenu est épuisé par un mélange d'éther sulfurique et d'éther de pétrole (1 : 1 V/V) dans lequel l'acide glycolique est soluble (BALANDARD, 1951).

Si le caractère dichotomique de cette méthode n'est pas à négliger, il faut malheureusement reconnaître son faible rendement, sa lenteur et la mauvaise élimination des constituants phénoliques présents dans divers végétaux, extraits en même temps que les acides aliphatiques ; ils peuvent être pour nous une cause d'erreur non négligeable dans les méthodes d'investigation analytiques décrites ultérieurement.

B - TECHNIQUES PERSONNELLES

Il paraissait donc indispensable de mettre au point une méthode d'extraction aussi simple que possible, rapide et évidemment d'un rendement satisfaisant, de manière à pouvoir isoler correctement les acides organiques et même les doser avec toute la précision souhaitable.

Pour cela, il fallait éliminer convenablement les polyphénols aussi bien que tous autres constituants gênants du matériel initial (cynarine, etc...).

Nous avons mis au point plusieurs protocoles d'extraction intervenant soit après hydrolyse acide ou alcaline du matériel végétal, soit directement et sans hydrolyse.

Afin de libérer les différents composés organiques acides de leurs combinaisons, nous avons hydrolysé le matériel végétal à l'aide d'hydroxyde de sodium en solution normale ou d'acide sulfurique concentré dilué au quart, avant d'effectuer l'extraction. Nous pensions ainsi faciliter la défécation de nombreux constituants pour ne retenir que les seuls acides.

Ces méthodes d'attaque très agressives et pour le moins inhabituelles en phytochimie, ne nous semblaient pas, à priori, un inconvénient dans la mesure où notre objectif visait exclusivement la séparation et l'isolement des acides-alcools de manière quantitative.

I - EXTRACTION APRES HYDROLYSE ALCALINE

1) - Hydrolyse

20 g de feuilles sèches d'Artichaut sont réduites en poudre grossière, puis additionnés de 150 cm³ d'eau distillée ;

le milieu est alcalinisé à pH 9 au moyen d'une solution normale d'hydroxyde de sodium.

Après ébullition sous réfrigérant à reflux, pendant une heure, le décocté refroidi est filtré, puis décoloré sur charbon (noir Norit) jusqu'à obtention d'un filtrat incolore.

2) - Extraction

Le filtre est rincé 2 fois avec de l'eau alcaline (pH 9) afin d'entraîner tous les sels des acides organiques dans le filtrat.

La solution est ensuite acidifiée à pH 1,5 à l'aide d'acide chlorhydrique concentré. Dans ces conditions, les sels repassent sous forme d'acide et cette solution est extraite, en ampoule à décantation, par 150 cm³ d'un solvant organique peu miscible à l'eau, constitué par du (n)butanol et de l'acétate d'éthyle (1 : 1 V/V).

En effet, il fallait trouver un solvant ou un mélange de solvants organiques peu ou non miscible à l'eau, dans lequel les acides organiques aliphatiques soient solubles et qui puissent facilement distiller à basse température. Cependant, si cette liqueur butanolique entraîne environ 7 % d'eau, ce qui facilite le passage d'ions minéraux en phase organique, il se forme entre l'eau et le (n)butanol, un azéotrope qui distille facilement. Cette liqueur est alors concentrée sous pression réduite à la température de 50°C dans un évaporateur rotatif type Buchi. L'eau est donc entièrement éliminée dès le début de l'opération. Lorsque le milieu est totalement anhydre, il apparaît un précipité constitué par des sels minéraux

de sodium, de potassium (et des sucres) qui avaient été entraînés et qui peuvent alors être séparés par filtration. Ce filtrat sera à nouveau concentré sous pression réduite jusqu'à élimination du butanol. Il reste, en fin d'opération, un liquide d'aspect huileux de couleur cognac qui constituera notre matériel d'étude.

II - EXTRACTION APRES HYDROLYSE ACIDE

20 g de feuilles sèches de Cynara scolymus (L.) sont mis en contact avec 100 cm³ d'eau, additionnés de 10 cm³ d'acide sulfurique dilué au quart.

Après ébullition sous réfrigérant à reflux pendant une heure, la liqueur est filtrée puis alcalinisée à pH 8 au moyen d'hydroxyde de sodium. Cette solution est alors décolorée sur noir Norit puis, après obtention d'un filtrat clair, on procède à l'extraction butanolique dans les conditions précédemment décrites, après acidification préalable.

Il était important de connaître la qualité et la quantité des acides-alcools libres pouvant être retirés du matériel végétal sans l'intervention de procédés brutaux comme l'ont été les hydrolyses pratiquées précédemment visant à séparer la totalité des acides-alcools.

Pour cela, nous avons utilisé pour l'extraction, un solvant organique : le méthanol, qui se substitue, dans le protocole décrit ci-dessous, à l'extraction aqueuse acide ou alcaline.

III - EXTRACTION ACIDE SANS HYDROLYSE

20 g de plantes sèches sont broyées finement puis additionnés de 250 cm³ de méthanol acidifié par 2 cm³ d'acide sulfurique concentré. La solution méthanolique est ainsi acidifiée à pH 6, afin de libérer les acides de leurs sels, sans toutefois dénaturer profondément les composés ou combinaisons préexistantes.

Après 15 minutes de contact avec le solvant, la poudre est agitée vigoureusement à l'aide d'un broyeur pendant 15 minutes à 5 000 tours. La liqueur est séparée par filtration sur Buchner et le résidu de filtration est rincé 2 fois par 100 cm³ de méthanol.

Les liqueurs méthanoliques réunies sont alors évaporées sous pression réduite à 40°C. Après addition de 100 cm³ d'eau distillée, la solution est alcalinisée à pH 8 par du carbonate de sodium à 5 % en solution aqueuse. Dans ces conditions, la chlorophylle précipite, puis la solution, après filtration, est décolorée à l'aide de noir animal. La liqueur ainsi clarifiée est traitée comme précédemment : après avoir été acidifiée à pH 1,5 à l'aide d'acide chlorhydrique, cette solution est additionnée d'un mélange de butanol et d'acétate d'éthyle (1 : 1 V/V). Après agitation dans une ampoule à décanter, les acides sont extraits par trois fois 50 cm³ du mélange précité. Les liqueurs butanoliques réunies sont concentrées sous pression réduite à 50°C jusqu'à un volume de 2 cm³. Cet extractum servira par la suite à l'étude analytique et pharmacodynamique.

C H A P I T R E I I

CARACTERES ANALYTIQUES QUALITATIFS DES EXTRAITS BUTANOLIQUES D'ARTICHAUT

Sur les extraits purifiés et préparés suivant les méthodes indiquées, nous avons caractérisé les divers constituants acides.

Préalablement à cette étude, on vérifie l'absence de sucres réducteurs (liqueur de Fehling et glucose-oxydase), de tanins et de composés polyphénoliques du groupe de la cynarine (réaction d'ARNOW (ARNOW, 1937 ; in SCEMAMA et GARDE, 1971 ; in STAHL et SCHORN, 1961)). Quant aux produits d'hydrolyse de cette dernière, ils sont absorbés sur charbon et n'existent plus dans l'extrait. On constate leur absence en soumettant ces extraits à la chromatographie en couche mince sur gel de silice, après migration dans le système de solvant : benzène-dioxane-acide acétique (90-25-4 V/V), la révélation par la benzidine-diazotée ne permet pas de mettre en évidence la présence d'acide caféique. D'autre part, la réaction à l'acide thiobarbiturique est négative ce qui nous permet de conclure à l'absence d'acide quinique.

Dans ces conditions, nous sommes amenés à penser qu'il ne restera que les acides aliphatiques dans ces extraits.

A - MISE EN EVIDENCE DES ACIDES

REACTIONS COLOREES TRADITIONNELLES

1) - Réaction de BERG

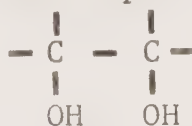
La solution butanolique, résultant des diverses extractions de l'Artichaut, est utilisée pour la caractérisation des acides-alcools. Dans deux tubes à essais sont introduites deux gouttes de cette solution, puis le butanol est éliminé par chauffage au bain-marie. Sur les résidus, les réactions de BERG (in PESEZ et coll., 1966) et d'UFFELMANN (in LEBEAU et COURTOIS, 1938) sont fortement positives, ce qui indique la présence d'acides-alcools.

Des réactions moins générales peuvent ensuite être appliquées, ayant valeur indicative quant à la nature des composés présents dans la solution.

2) - Réactions de DENIGES

a - Deniges I (DENIGES et coll., 1930) : réaction au résorcinol sulfurique

Dans 0,5 cm³ de la solution, quelques cristaux de résorcine sont dissous. En ajoutant 0,5 cm³ d'acide sulfurique, une coloration rouge sang se manifeste. Cette coloration peut être due aux acides glycérique et tartrique ainsi qu'à tout corps susceptible d'oxydation par l'acide sulfurique et correspondant à la séquence



Cette réaction, bien que non spécifique, est néan-

moins intensément positive dans notre cas, laissant ainsi prévoir la présence de ces deux acides ou de l'un d'entre eux au moins.

b - Deniges II (DENIGES et coll., 1930) : réaction au sulfate mercurique

0,5 cm³ de solution sont additionnés de 0,5 cm³ de réactif au sulfate mercurique de Deniges. Après ébullition, on ajoute deux gouttes de solution de permanganate de potassium à 2 %. La coloration violette due au permanganate disparaît aussitôt.

Cette réaction, passant pour spécifique de l'acide citrique, nous permet donc de prévoir la présence de ce dernier dans l'extrait d'Artichaut.

c - Deniges III (DENIGES et coll., 1930) : réaction à l'acétate mercurique

A 0,5 cm³ du réactif à l'acétate mercurique de Deniges, nous ajoutons 0,5 cm³ de solution. Après ébullition du mélange et addition de deux gouttes de solution aqueuse de permanganate de potassium à 2 %, nous obtenons un précipité blanc abondant.

Cette réaction passe pour spécifique de l'acide malique.

3) - Réaction au galacol-sulfurique (BALANSARD et BERNARD, 1950)

Après addition de 0,5 cm³ d'acide sulfurique à 1 cm³ de la solution, puis d'une goutte de solution alcoolique de

gaïacol à 2 % et de 0,5 cm³ d'acide acétique, il apparaît une coloration bleue.

Cette réaction est utilisée pour caractériser l'acide glycolique. Positive dans notre cas, elle n'est cependant pas spécifique.

Afin de préciser davantage la nature des acides présents dans l'extrait, nous nous sommes adressés à la technique de chromatographie sur couche mince (C.C.M.). Nous pouvions espérer, grâce à cette technique, séparer ces différents acides aliphatiques et les révéler au moyen de réactifs plus spécifiques.

B - CARACTERISATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE (C.C.M.)

Après avoir expérimenté plusieurs systèmes de solvants, après chromatographie sur du silical G Merck (plaque de verre 20 x 20, épaisseur du support 0,25 mm), nous en avons retenu deux :

- le premier nous permet de chromatographier les composés sous leur forme acide ;
- le second sous forme de sel d'ammonium.

I - C.C.M. DES COMPOSES SOUS FORME ACIDE

1) - Conditions opératoires

. Solvant I : Toluène-formiate d'éthyle-acide formique (50-40-10 V/V)

. Substances déposées : solutions témoins à 1 % dans l'alcool des acides (Merck) suivants : acide citrique, acide glycérique, acide glycolique, acide lactique, acide malique, acide succinique, acide tartrique, acide fumarique, acide maléique.

Dépôt : 10 μ l.

Liqueur extractive (après hydrolyse alcaline)

Dépôt : 10 μ l.

Migration : effectuée à 20°C sur une hauteur de 15 cm.

2) - Choix des révélateurs

a) · Révélateurs généraux :

- Réactif de SCHWEPPE (SCHWEPPE, 1959)

Ce révélateur est considéré comme un réactif des fonctions acides. Sa composition est la suivante : 20 cm³ d'une solution aqueuse à 10 % de glucose additionnés de 20 cm³ d'une solution alcoolique à 10 % d'aniline complétés à 100 cm³ par du (n)butanol.

La plaque est pulvérisée puis chauffée à 100-110°C pendant dix minutes jusqu'à apparition de taches brunes.

- Réactif phosphomolybdique (KRITCHEWSKY et KIRK, 1952)

Avec ce réactif, nous pouvons repérer par l'apparition de taches bleues, les composés à fonction réductrice comme les alcools. Pour ce faire, nous pulvérisons sur la plaque une solution alcoolique à 5 % d'acide phosphomolybdique.

La pulvérisation est suivie d'un chauffage à l'étuve à 120°C.

- Réactif au bleu de Bromophénol (RANDERATH, 1971)

Ce réactif en solution alcoolique à 0,04 % révèle les acides par apparition de taches jaunes sur fond bleu. Cette

révélation est assurée après élimination de l'acide formique par chauffage à 60°C pendant une heure.

b Révélateurs plus spécifiques :

Afin de préciser sur plaque la nature de chacun de ces constituants, nous avons utilisé des réactifs particuliers et plus spécifiques de chaque acide. Nous obtenons ainsi, soit des colorations, soit des fluorescences différentes, permettant d'identifier avec plus de sécurité des acides de Rf voisin, si non identiques.

Six réactifs sont utilisés pour révéler les chromatogrammes comparativement aux acides témoins :

• R1 : réactif à l'acide chromotropique (BEROZA, 1963)

Ce réactif est préparé à l'aide de deux solutions :

- solution A : solution aqueuse à 10 % de dihydroxy-1-8 naphthalène 3-6 disulfonate de sodium.
- solution B : solution d'acide sulfurique concentré diluée au demi.

Mélanger un volume de la solution A avec 5 volumes de la solution B.

La plaque après pulvérisation est chauffée à 100-110°C pendant 30 minutes.

La lecture du chromatogramme sera faite en lumière visible et en U.V. à 366 nm.

Dans ces conditions, l'acide glycolique donne une tache bleue, l'acide malique une tache vert jaune, de fluorescence jaune intense.

• R 2 : réactif au naphto-résorcinol sulfurique (STAHL, 1969)

Mélanger au moment de l'emploi un volume d'une solution alcoolique à 0,2 % de naphto-résorcinol et un volume d'acide sulfurique concentré dilué au 1/5 dans de l'eau.

Après pulvérisation et chauffage, la lecture du chromatogramme sera faite en U.V. à 366 nm, révélant ainsi l'acide malique grâce à sa fluorescence bleue.

• R 3 : réactif à l'orcinol sulfurique (HUMMEL, 1949)

Une solution alcoolique à 0,2 % de dihydroxy 3-5 toluène et d'acide sulfurique dilué au 1/5 mélangée volume à volume, est pulvérisée sur la plaque, puis chauffée à 110°C pendant 10 minutes. La lecture sera faite en U.V. à 366 nm, et nous obtenons la même fluorescence pour l'acide malique.

• R 4 : réactif à la vanilline sulfurique de HAUSSLER (in GRIGNARD, 1945)

Nous pulvérisons, dans un premier temps, une solution alcoolique à 1 % de vanilline puis, après séchage, pulvérisation d'une solution d'acide sulfurique concentré diluée au quart. Après chauffage à 110°C pendant 10 minutes, il y a apparition d'une tache bleu violacé caractéristique de l'acide citrique.

• R 5 : réactif de FURTH et CASARES (in GRIGNARD, 1945)

Sur une plaque préalablement chauffée à 90°C, nous pulvérisons une solution d'anhydride acétique et de pyridine dans les proportions : 1 volume à 5 volumes. Il y a apparition immédiate de taches roses caractéristiques de l'acide citrique.

La présence éventuelle d'acide tartrique serait visualisée par une coloration verte.

● R 6 : réactif à la (p)-nitraniline diazotée
(SWAIN, 1953)

On prépare les 4 solutions suivantes :

- solution A : (p)-nitraniline 0,30 g additionné de 100 ml d'acide chlorhydrique 2 N.

- solution B : solution à 5 % de nitrite de sodium dans l'eau.

- solution C : solution à 20 % d'acétate de sodium dans l'eau.

- solution D : solution à 15 % de carbonate de sodium dans l'eau.

Au moment de l'emploi, on mélange 2 cm³ de sol. A et trois à cinq gouttes de solution B, puis on additionne 8 cm³ de solution C. Après pulvérisation et séchage du chromatogramme, nous pulvérisons avec la solution D jusqu'à apparition de taches rouge violacé, correspondant notamment à l'acide malique.

3) - Application à l'Artichaut

a - Révélation par les réactifs généraux

● Extrait obtenu après hydrolyse alcaline

Dans ces conditions, l'extrait d'artichaut fournit un chromatogramme avec 7 taches nettes dont les R_f respectifs figurent au tableau T 3. Nous reproduisons également l'image de ce chromatogramme (fig. F1).

TAB. (T3)

COMPARAISON DES Rf DES ACIDES TEMOINS ET DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT

: SOLVANT I (Toluène-Formiate d'éthyle-Acide formique				
: 50-40-10 V/V				
:				
:				
: REVELATEURS				
:				
TEMOINS	-----			Rf
	SCHWEPPE	PHOSPHOMOLYBDIQUE		
Acide tartrique	+	+		0,11
Acide glycérique	+	+		0,11
Acide citrique	+	+		0,17
Acide malique	+	+		0,21
Acide glycolique	+	+		0,30
Acide maléique	+	-		0,40
Acide lactique	+	+		0,42
Acide succinique	+	-		0,45
Acide fumarique	+	-		0,53

: SOLVANT I (Toluène-Formiate d'éthyle-Acide formique				
: 50-40-10 V/V				
:				
:				
: REVELATEURS				
:				
	-----			Rf
	SCHWEPPE	PHOSPHOMOLYBDIQUE		
	+	+		0,11
	+	+		0,17
EXTRAIT	+++	+		0,21
BUTANOLIQUE	+	+		0,30
D'ARTICHAUT	+++	+		0,43
	++			0,53
	++	+		0,68

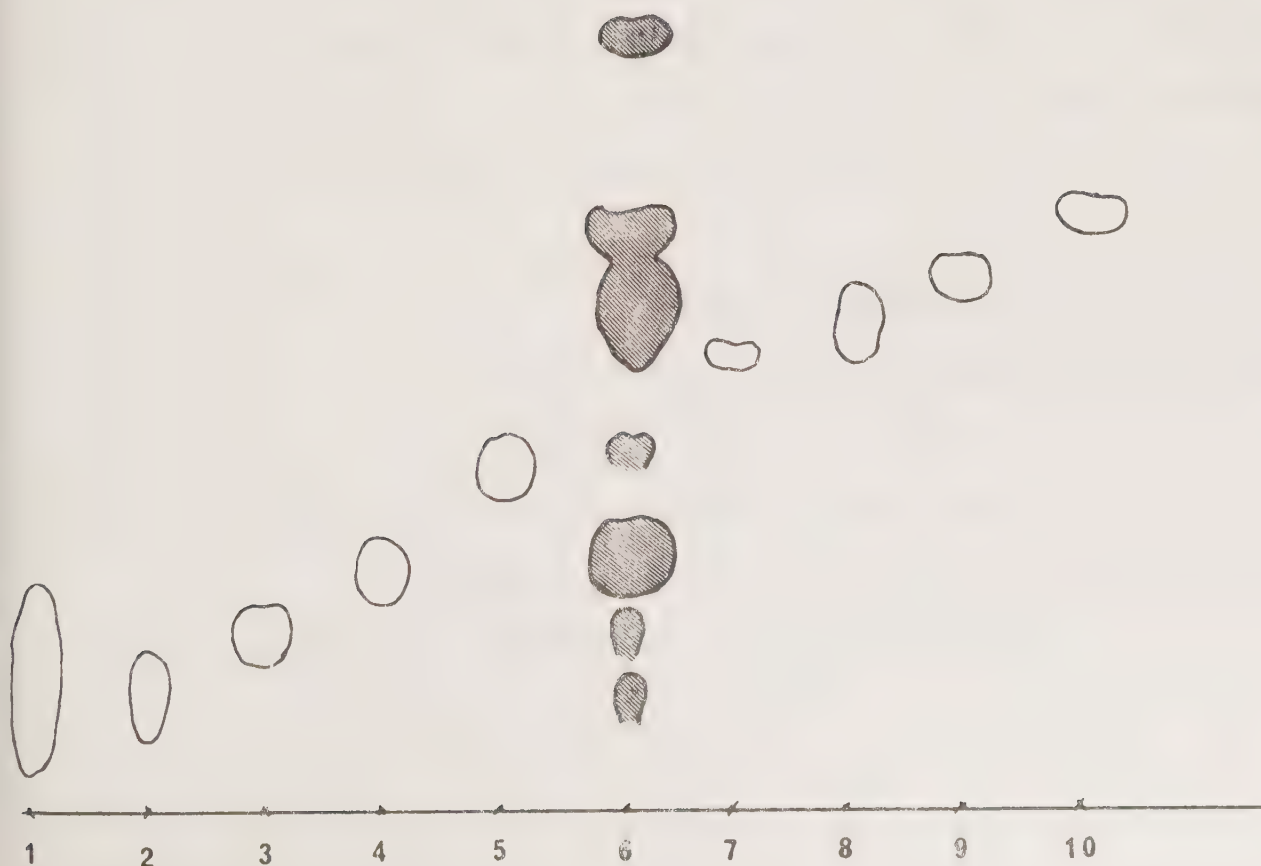
FIG.(F1) : CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT

Solvant : toluène-formiate d'éthyle-acide formique (50-40-10 V/V)

Révélateur : réactif de SCHWEPPE

Distance de migration : 15 cm

- 1 - Acide tartrique
2 - Acide glycérique
3 - Acide citrique
4 - Acide malique
5 - Acide glycolique
6 - Extrait butanolique d'Artichaut
7 - Acide maléique
8 - Acide lactique
9 - Acide succinique
10 - Acide fumarique



Cette technique permet, dans un premier temps, de confirmer, par comparaison des Rf, la présence probable des acides citrique, malique, fumarique et glycolique, entrevus grâce aux réactions colorées. Par contre, nous ne pouvons caractériser les corps ayant des Rf voisins. C'est le cas du groupe de l'acide tartrique et glycérique d'une part, des acides malique, succinique et lactique d'autre part.

• Extrait obtenu après hydrolyse acide

On retrouve les mêmes spots que précédemment. Il faut cependant signaler que la tache correspondant à l'acide fumarique est de bien moindre importance qu'après hydrolyse alcaline.

• Extrait obtenu sans hydrolyse

Après extraction méthanolique, l'extrait obtenu est chromatographié dans les mêmes conditions que précédemment. Le chromatogramme fournit les mêmes spots. Cependant, on remarque que pour des dépôts identiques aux précédents, les taches sont d'une intensité plus importante, ce qui semble impliquer un meilleur rendement d'extraction pour cette méthode.

b - Révélation par les réactifs particuliers

• Extrait obtenu après hydrolyse alcaline

Nous avons résumé dans le tableau T 4 les Rf ainsi que les colorations différentielles des acides de référence.

Quant à l'extrait d'Artichaut, il fournit avec ces différents réactifs les résultats suivants :

REVELATEURS GENERAUX			REVELATEURS PARTICULIERS							
Rf	Acides témoins	Réactif de SCHWEPPE	Réactif phos- phomolybdique	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	
0,11	Acide tartrique	+	+	-	-	-	-	-	-	
0,11	Acide glycérique	+	+	-	-	-	-	-	-	
0,17	Acide citrique	+	+	-	-	-	col. violette	col. rose	-	
0,21	Acide malique	+	+	col. vert-jaune	fluo. jaune bleue	fluo. bleue	-	-	col. rouge violacé	
0,30	Acide glycolique	+	+	col. bleue	-	-	-	-	-	
0,40	Acide maléique	+	-	-	-	-	-	-	-	
0,42	Acide lactique	+	+	-	-	-	-	-	-	
0,45	Acide succinique	+	-	-	-	-	-	-	-	
0,53	Acide fumarique	+	-	-	-	-	-	-	-	

* = Acides présents dans l'extrait butanolique d'Artichaut

- Avec le réactif R 1, une tache de Rf 0,21 de coloration vert jaune et de fluorescence jaune intense en U.V., analogue à celle donnée par le témoin acide malique, et une tache Rf 0,30 de coloration bleue analogue à celle donnée par le témoin d'acide glycolique (Rf 0,30).

- Les réactifs R 2 et R 3 nous permettent de confirmer la présence de l'acide malique (Rf 0,21) donnant dans les deux cas une fluorescence bleue intense à 366 nm, identique à celle donnée par le témoin. La présence de cet acide est encore confirmée par le réactif 6 donnant un spot rouge violacé de Rf 0,21.

- Les réactifs R 4 et R 5 révèlent une tache de Rf 0,17, de coloration bleu violacé et rose, suivant le réactif employé. Ces spots ont une coloration et un Rf identiques à ceux donnés par l'acide citrique.

La présence de ces divers acides dans l'extrait peut donc être tenue pour certaine.

• Extrait obtenu après hydrolyse acide

Cependant, en utilisant le réactif à l'acide chromatopique, qui ne révélait que l'acide malique et glycolique, il apparaît une tache brun orangé de Rf 0,50. Il est donc possible par cette nouvelle technique de mettre en évidence un autre composé organique, non identifié pour l'instant.

• Extrait obtenu sans hydrolyse

Comme précédemment, nous obtenons les mêmes taches correspondant aux acides malique et glycolique ainsi qu'un spot

brun orangé de Rf 0,50. Cette technique nous permettait également de mettre en évidence ce composé organique inconnu, et de comparer grossièrement les teneurs des divers composés constituant le bloc des acides. Ces résultats sont consignés dans le tableau T 5.

II - C.C.M. DES COMPOSES SOUS FORME DE SELS D'AMMONIUM

Afin de tenter la séparation de divers acides aux Rf voisins, et notamment du groupe maléique, lactique et succinique, nous les avons chromatographiés sous forme de sels d'ammonium en utilisant la technique suivante :

1) - Conditions opératoires

. Solvants :

- Solvant I : éthanol-chloroforme-ammoniaque à 25 % (68-15-17 V/V)

- Solvant II : éthanol-tétrahydrofurane-ammoniaque à 25 % (56-22-22 V/V)

. Substances déposées :

- solution à 1 % dans l'alcool des acides citrique, glycérique, glycolique, lactique, malique, succinique, maléique.

Dépôt: 10 µl.

- liqueur extractive d'Artichaut.

Dépôt : 10 µl.

. Migration : effectuée à 20°C sur une hauteur de 15 cm.

2) - Choix des révélateurs

Après séchage de la plaque, nous pulvérisons une solution alcoolique à 0,1 % de dichloro-2-6 phénolindophénol (PASSE-

TAB. (75)

EVALUATION PAR C.C.M. DES TENEURS RESPECTIVES EN ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS DES DIVERS EXTRAITS BUTANOLIQUES D'ARTICHAUT

ACIDES	Rf	EXTRAITS D'ARTICHAUT OBTENUS		
		Après hydrolyse alcaline	Après hydrolyse acide	Sans hydrolyse
Acide glycérique : 0,11		+	++	++
Acide citrique : 0,16		+	+	++
Acide malique : 0,21		++	+++	++++
Acide glycolique : 0,30		+	+	++
Acide lactique : 0,42		+++	+++	+++
Acide succinique : 0,45		++	++	+++
Composé inconnu : 0,50		+	++	+++
Acide fumarique : 0,53		+++	+	+

Solvant : Toluène-Formiate d'éthyle-Acide formique (50-40-10 V/V)
 Révélateurs : Révélateurs généraux et révélateurs particuliers.

RA et coll., 1964), utilisée comme indicateur de pH. Il y a aussitôt apparition de taches roses.

3) - Application à l'Artichaut

Le tableau T 6 résume les différents Rf des substances témoins déposées et les figures F 2 et F 3 représentent l'image du chromatogramme.

Ainsi, grâce à la formation sur plaque des sels d'ammonium et à l'utilisation comparative de deux systèmes de solvants différents, on apporte une nouvelle confirmation de la présence des acides malique, citrique, fumarique et glycolique. On sépare également par ce procédé les groupes tartrique et glycérique d'une part, succinique, lactique et maléique d'autre part, dont les Rf sont, cette fois, très différents.

III - CONCLUSIONS

L'analyse chromatographique sur couche mince, procédé général de détection, nous a permis, grâce à l'emploi de plusieurs systèmes de solvants et de réactifs spécifiques, de mettre en évidence divers acides-alcools.

Nous avons pu ainsi confirmer certains des résultats avancés par BALANSARD, à savoir que l'Artichaut et d'autres plantes étaient relativement riches en acides-alcools tels que les acides glycolique, glycérique, malique et lactique. Mais nous avons pu en outre mettre en évidence la présence des acides citrique et succinique, montrant ainsi, dans ce bloc acide, la présence dominante d'éléments du cycle de KREBS.

Cependant, si les méthodes d'extraction choisies

TAB. (76) : Rf DES DIFFERENTS CONSTITUANTS DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT ET DES DIVERS TEMOINS

REVELEATEUR DICHLOROPHENOL INDOPHENOL		
TEMOINS	SOLVANT I (éthanol-chloroforme-ammoniaque à 25 %) 68-15-17 V/V Rf	SOLVANT II (éthanol-tétrahydrofurane-ammoniaque à 25 %) 56-22-22 V/V Rf
Acide glycérique	0	0
Acide maléique	0	0,05
Acide malique	0,06	0,04
Acide fumarique	0,18	0,16
Acide succinique	0,20	0,10
Acide citrique	0,26	0
Acide glycolique	0,34	0,26
Acide lactique	0,50	0,40
Acide tartrique	-	-

REVELEATEUR DICHLOROPHENOL INDOPHENOL		
EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT	SOLVANT I (éthanol-chloroforme-ammoniaque à 25 %) 68-15-17 V/V Rf	SOLVANT II (éthanol-tétrahydrofurane-ammoniaque à 25 %) 56-22-22 V/V Rf
	0	0
	0,06	0,05
	0,18	0,16
	0,20	0,10
	0,25	0
	0,35	0,25
	0,50	0,42

G.(F2): CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT

Solvant : éthanol-tétrahydrofurane-ammoniaque 25 % (56-22-22 V/V)

Révélateur : dichlorophénol-indophénol

Distance de migration : 15 cm

- 1 - Acide glycérique
- 2 - Acide malique
- 3 - Acide maléique
- 4 - Acide fumarique
- 5 - Acide succinique
- 6 - Extrait butanolique d'Artichaut
- 7 - Acide citrique
- 8 - Acide glycolique
- 9 - Acide tartrique
- 10 - Acide lactique



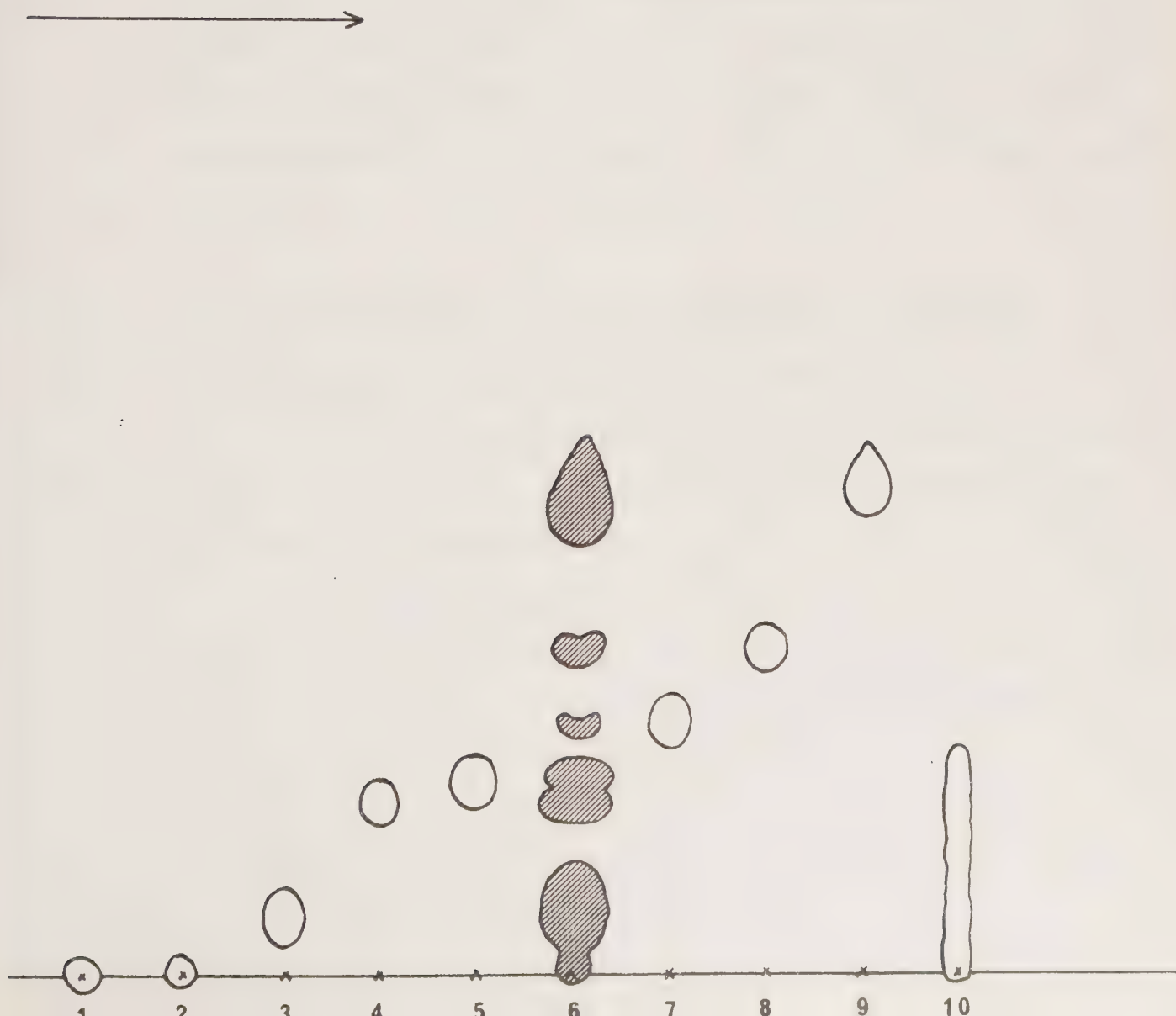
3.(F3): CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT

Solvant : éthanol-chloroforme-ammoniaque 25 % (68-15-17 V/V)

Révélateur : dichlorophénol-indophénol

Distance de migration : 15 cm

- 1 - Acide glycérique
- 2 - Acide maléique
- 3 - Acide malique
- 4 - Acide fumarique
- 5 - Acide succinique
- 6 - Extrait butanolique d'Artichaut
- 7 - Acide citrique
- 8 - Acide glycolique
- 9 - Acide lactique
- 10 - Acide tartrique



nous ont permis d'éliminer les polyphénols, les acides phénols, la cynarine ou les produits de dégradation, il n'apparaît pas indispensable d'effectuer les extractions après hydrolyses acide ou alcaline destinées surtout à déféquer les milieux ; il suffit d'attaquer la plante d'origine avec un solvant aussi efficient que le méthanol acidifié par l'acide sulfurique pour pouvoir dégager les acides de leurs combinaisons vraisemblablement salines.

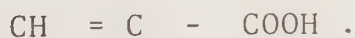
Toutefois, nos identifications ne pourront être tenues pour certaines que dans la mesure où nous aurons confirmées encore, en séparant le groupe des acides par chromatographie gazeuse, et en vérifiant, en cas de litige, la détermination de leur structure par les méthodes physicochimiques d'analyse fondamentale. De plus, il reste à préciser la nature du composé acide, de l'Artichaut, repéré dans les extraits obtenus après hydrolyse acide ou sans hydrolyse et non identifié.

C - IDENTIFICATION DU COMPOSE INCONNU DE L'ARTICHAUT

I - HYPOTHESE SUR LA NATURE DE CE COMPOSE

Il était possible de formuler une hypothèse quant à la nature de ce corps. L'artichaut contient en effet un principe amer : la cynaropicrine.

Ce guaïanolide, ayant comme structure de base celle du gaïzulène, porte une fonction alcool secondaire estérifiée par un acide alcool : l'acide α -hydroxyméthylacrylique,



Ce dernier pouvait avoir été séparé du noyau fondamental de la cynaropicrine lors de l'extraction acide ou encore se trouver à l'état libre dans la plante. Nous avons donc tenté de détecter une éventuelle double liaison dans la structure de notre composé inconnu.

II - MISE EN EVIDENCE DE LA LIAISON ETHYLENIQUE

Afin de mettre en évidence la double liaison, nous nous sommes adressés à la technique classique des dérivés mercuriels d'addition.

1) - Technique de préparation (KIRCHNER, 1967)

Le réactif est constitué par une solution d'acétate mercurique à 5,6 % dans le méthanol, additionné de 1 cm³ d'eau et de 0,4 cm³ d'acide acétique glacial. A 25 cm³ de cette solution mercurielle, nous ajoutons 1 g de l'extrait butanolique obtenu après hydrolyse acide. Cette solution est abandonnée à la température du laboratoire pendant 24 heures.

Après ce délai, le méthanol est évaporé sous pression réduite à 30°C. Le résidu sec obtenu est dissous dans 50 cm³ de chloroforme. La solution chloroformique est ensuite débarrassée de l'excès d'acétate mercurique ; soit par lavage 5 fois avec 25 cm³ d'eau, soit par addition de sulfate d'hydrazine. La solution chloroformique est ensuite filtrée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée sous pression réduite à 30°C. Cette solution sera ensuite chromatographiée.

2) - C.C.M. des composés d'addition

a - Conditions opératoires

Matériel : plaque de verre de 20 x 20 cm

Adsorbant : Silicagel G (Merck)

épaisseur 0,25 mm.

Solvants :

. Solvant I : Méthyléthylcétone-n) propanol-éthanol-ammoniaque (45,5-4,5-18-32 V/V).

. Solvant II : Toluène-formiate d'éthyle-acide formique (50-40-10 V/V).

Substance déposée :

- composés mercuriels d'addition (éventuels) de l'extrait d'Artichaut après hydrolyse acide.

Dépôt : 10 μ l.

Migration : effectuée à 20°C sur une hauteur de 10 cm.

Révélateur : Après séchage de la plaque, nous pulvérisons une solution à 2 % dans le méthanol de diphényl-carbazide susceptible de donner une réaction colorée avec l'ion mercure.

b - Résultats et discussion

Dans ces conditions, nous obtenons une tache violette dont le Rf est de 0,20 dans le solvant I (méthyléthylcétone-n-propanol-éthanol-ammoniaque (45,5-4,5-18-32 V/V) et de 0,72 dans le solvant II (toluène-formiate d'éthyle-acide formique (50-40-10 V/V)).

Nous avons donc pu mettre en évidence par hydrolyse

acide et séparer, grâce à la C.C.M., un corps inconnu présentant des réactions d'acide-alcool et possédant une liaison éthylénique. L'hypothèse selon laquelle ce composé pourrait être l'acide α hydrométhylacrylique, est renforcée par la présence d'une liaison éthylénique dans sa structure.

III - PURIFICATION DU PRODUIT PAR C.C.M. PREPARATIVE

Afin de procéder à une étude analytique plus précise, nous avons utilisé la technique de C.C.M. préparative en déposant 100 μ l de l'extrait sur des plaques de verre de 20 x 20 cm recouvertes de Silicagel G d'une épaisseur de 750 μ m.

Le solvant de migration employé est le solvant acide indiqué précédemment.

Après grattage des plaques et élution dans l'alcool à 90°, on obtient quelques milligrammes du produit inconnu, permettant d'entreprendre son étude analytique.

IV - CARACTERES ANALYTIQUES

1) - Réactions colorées

Le produit présente des réactions positives aux réactifs de BERG et UFFELMANN, ce qui laisse supposer sa structure acide-alcool.

2) - Chromatographie en couche mince

Le composé est soumis aux techniques de C.C.M. et on le compare à d'autres acides et acides-alcools ayant des R_f voisins, avec lesquels il pourrait être confondu (tableau T 7).

a - Conditions opératoires

Matériel : plaque de verre de 20 x 20 cm

Adsorbant : Silicagel G (Merck)

épaisseur de 0,25 mm

Solvants :

. Solvant I : Ethanol-tétrahydrofurane-ammoniaque à 25 % (56-22-22 V/V).

. Solvant II : Ethanol-chloroforme-ammoniaque à 25 % (68-15-17 V/V).

. Solvant III : Toluène-formiate d'éthyle-acide formique (50-40-10 V/V).

Substances déposées :

- solution à 1 % dans l'éthanol des acides lactique, fumarique et succinique.

Dépôt : 10 μ l.

- solution dans l'éthanol du composé inconnu.

Dépôt : 10 μ l.

Migration : effectuée à 20°C sur une hauteur de 15 cm.

Révélateurs :

- solution alcoolique à 0,1 % de dichlorophénol-indophénol : ce révélateur est employé pour les chromatogrammes développés dans les systèmes de solvant I et II.

- le réactif de SCHWEPPE, le réactif phosphomolybdique, le réactif au bleu de bromophénol et le réactif chromotropique seront utilisés pour la révélation des chromatogrammes développés dans le système de solvant III.

TAB (17) : Rf DE PLUSIEURS ACIDES-ALCOOLS DANS DIVERS SYSTEMES DE SOLVANTS

	SOLVANT I	SOLVANT II	SOLVANT III
SUBSTANCES	Ethanol-tétrahydrofurane- ammoniaque 25 % (56-22-22 V/V)	Ethanol-chloroforme- ammoniaque 25 % (68-15-17 V/V)	Toluène-formiate d'éthyle- acide formique (50-40-10 V/V)
Acide lactique	0,40	0,50	0,40
Composé inconnu	0,50	0,48	0,50
Acide fumarique	0,16	0,18	0,53
Acide succinique	0,10	0,20	0,45

b - Résultats et discussion

Le tableau T 7 donne les Rf de ces composés chromatographiés dans les différents solvants.

Il est facile de constater que seul l'acide lactique pouvait présenter quelques analogies de Rf avec le composé inconnu, bien que dans les systèmes de solvant I et III, la séparation est relativement nette.

D'autre part, la coloration particulière par l'acide chromotropique du composé non identifié permettait de le différencier des autres acides et acides-alcools.

Restait à préciser sa structure. Partant de notre hypothèse initiale, et en vue de la confirmer, nous avons extrait la cynarine de l'artichaut. Celle-ci subit ensuite une hydrolyse menée dans les mêmes conditions que précédemment en vue de libérer l'acide α -hydroxyméthylacrylique, de le séparer et de le comparer au corps inconnu.

V - EXTRACTION DU MOTIF ACRYLIQUE A PARTIR DE LA CYNAROPICRINE

1) - Extraction de la cynaropicrine (MICHAUD J., 1964).

L'extraction de la cynaropicrine a été faite à partir de feuilles sèches de Cynara scolymus (L.). Dans un premier temps, nous préparons un extrait alcoolique par ébullition sous réfrigérant à reflux. Ainsi, 100 g de feuilles sèches d'Artichaut additionnées de 2 g de carbonate de calcium, sont épuisés par 500 cm³ d'éthanol à 95°E.

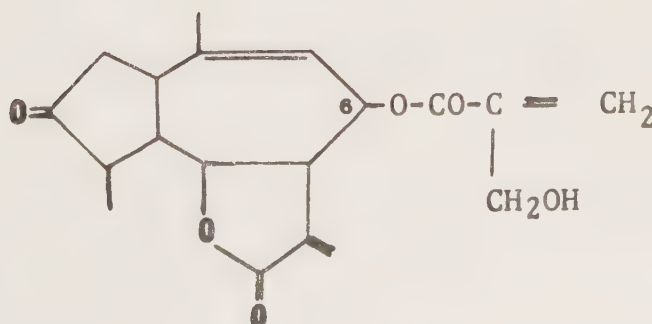
L'extrait alcoolique, ainsi obtenu, est filtré encore bouillant. L'élimination de l'alcool sous pression réduite

sera réalisée grâce à un évaporateur rotatif et par ajout progressif d'eau jusqu'à disparition complète de l'éthanol.

Le liquide aqueux ainsi obtenu est filtré afin d'éliminer la presque totalité de la chlorophylle et le filtrat est abandonné pendant 24 heures ; une deuxième filtration est alors pratiquée et la liqueur est ensuite épuisée 3 fois par 150 cm³ de chloroforme. Les liqueurs chloroformiques sont réunies puis concentrées sous pression réduite. Nous obtenons ainsi un liquide huileux jaune foncé très amer. Quelques mg de cette substance additionnés d'éther en présence d'acide sulfurique donnent la réaction colorée d'ASAHINA et YODA (1936) et nous permettent ainsi de confirmer la présence de cynaropicrine.

2) - Extraction du motif acrylique après hydrolyse de la cynaropicrine

La cynaropicrine, principe responsable de l'amertume de l'Artichaut, a été isolée par SUCHY (SUCHY et coll., 1960). Sa structure, de type sesquiterpénique lactonique, répond à la formule suivante :



Cette molécule du type gáñanolide est estérifiée en 6 par un acide-alcool facilement saponifiable par hydrolyse alcaline ou acide. Il s'agit de l'acide α hydroxyméthylacrylique (H. M.A.), produit non volatil trouvé pour la première fois en 1960 dans un produit d'origine naturelle (SUCHY et coll., 1960).

Afin d'obtenir cet acide, nous avons hydrolysé la cynaropicrine, d'une part au moyen d'hydroxyde de sodium en solution normale et d'autre part avec de l'acide sulfurique concentré dilué au quart. Les liqueurs ainsi obtenues sont amenées à pH 7, puis clarifiées après plusieurs passages sur charbon. Les deux liqueurs sont ensuite acidifiées par de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH 1,5. L'acide ainsi libéré de son sel de sodium sera extrait par le (n) butanol. La solution butanolique, ajustée à pH 4,5 par addition de bicarbonate de sodium, est concentrée sous pression réduite jusqu'à un volume final de 1 cm³.

A quelques gouttes de cet extrait, nous ajoutons 1 cm³ de réactif de BERG, nous pouvons ainsi observer une coloration jaune qui disparaît par addition d'acide chlorhydrique. Cette réaction, caractéristique des acides-alcools, nous permet de supposer la présence de l'acide de H.M.A., qui pourra ensuite être chromatographié.

3) - C.C.M. du motif acrylique : comparaison avec le produit inconnu

Le motif acrylique supposé extrait par le butanol acide, après saponification de la cynaropicrine, est traité par le réactif mercuriel afin de fixer le mercure sur la double liaison. Puis, nous avons soumis cette solution à la C.C.M..

a - Conditions opératoires

Matériel : plaque de verre de 20 x 20 cm.

Adsorbant : silicagel G (Merck)

épaisseur de 0,25 mm

Solvants :

. Solvant I : toluène-formiate d'éthyle-acide formique (50-40-10).

. Solvant II : méthyléthylcétone-n propanol-éthanol-ammoniaque (45,5-4,5-18-32 V/V).

Substances déposées :

- composés mercuriels d'addition sur motif acrylique.

Dépôt : 10 μ l.

- composés mercuriels d'addition sur l'extrait d'Artichaut après hydrolyse acide.

Dépôt : 10 μ l.

Migration : effectuée à 20°C sur une hauteur de 10 cm.

Révélateur : après séchage, pulvérisation d'une solution à 2 % dans le méthanol de diphénylcarbazine. Dans ces conditions, nous obtenons une coloration violette des spots.

b - Résultats et discussion

Nous avons résumé dans la tableau T 8 les Rf du composé non identifié et du corps obtenu par hydrolyse de la cynaropicrine.

Nous pouvons constater à la lecture de ce tableau, que le composé inconnu isolé par hydrolyse acide à le même Rf, dans les deux systèmes de solvant, que l'acide α hydroxyméthylacrylique (H.M.A.).

TAB.(T8) : Rf DE L'ACIDE α -HYDROXYMETHYLACRYLIQUE ET DU COMPOSE INCONNU

SUBSTANCES	SOLVANT I				SOLVANT II	
	SCHWEPPE	Phospho- molybdique	Acide chromotrope	Diphényl- carbazine	Diphényl- carbazine	
Motif acrylique extrait	0,50 : brun	0,50 : bleu	0,50 : brun orangé	-	-	-
Corps inconnu	0,50 : brun	0,50 : bleu	0,50 : brun orangé	-	-	-
Composé d'addition sur le motif acrylique	:	:	:	0,72 : violet	0,20 : violet	:
Composé d'addition sur le corps inconnu	:	:	:	0,72 : violet	0,20 : violet	:

D'autre part, nous avons employé plusieurs révélateurs nous permettant d'envisager la nature acide du composé inconnu (réactif de SCHWEPPE) et la présence de fonction réductrice (réactif phosphomolybdique). Enfin une coloration brune orangée à l'acide chromotropique identique à celle donnée par le témoin nous permettait de conclure à la présence, dans l'extrait butanolique d'Artichaut, d'H.M.A.

VI - RECHERCHE DE L'ACIDE α -HYDROXYMETHYLACRYLIQUE LIBRE DANS L'ARTICHAUT

La mise en évidence d'H.M.A. dans l'extractum obtenu après hydrolyse acide ne signifie pas nécessairement que cet acide se trouve à l'état libre dans l'artichaut. On peut en effet penser qu'il résulte de l'hydrolyse de la cynaropicrine attaquée en milieu acide.

Afin de mettre en évidence ce composé acide à l'état libre, nous avons choisi un solvant peu polaire, riche en chlorure de méthylène dans lequel les dérivés acryliques sont plus solubles que les autres acides alcools.

1) - Technique d'extraction

20 g de feuilles sèches d'Artichaut sont broyées finement, puis additionnés d'un solvant constitué de chlorure de méthylène, éther éthylique et de méthanol dans les proportions de 60-30-10 V/V. La poudre est laissée en contact pendant 15 minutes avec le solvant, puis agitée à l'aide d'un broyeur à 5 000 tours durant 15 minutes. Après filtration sur Büchner,

la poudre est rincée à l'aide de deux fractions de 100 cm³ du solvant précédent. Les liqueurs sont évaporées sous pression réduite à 50°, puis additionnées d'eau distillée ; la solution aqueuse est alors alcalinisée à l'aide de carbonate de sodium en solution à 10 %, puis à nouveau filtrée. On obtient dans ces conditions une liqueur jaune clair qui sera totalement décolorée à l'aide de noir animal.

Cette solution limpide est amenée à pH 1,5 par addition d'acide chlorhydrique concentré, puis épuisée par un solvant constitué par le mélange butanol-acétate d'éthyle dans les proportions 50-50 V/V. Les liqueurs butanoliques sont réunies puis évaporées sous pression réduite à 50° jusqu'à un volume de 1 cm³.

2)- Chromatographie de l'extrait butanolique

La C.C.M. est réalisée suivant la technique précédente, dans le solvant acide. La révélation, assurée par l'acide chromotrope et le bleu de bromophénol ne laissait apparaître qu'une seule tache de Rf 0,50, correspondant donc à l'H.M.A..

3° - Discussion des résultats

La présence de cet acide pourrait être attribuée à la saponification de la cynaropicrine extraite dans ces mêmes conditions.

Afin de vérifier que l'H.M.A. obtenu par cette méthode est bien à l'état libre dans les feuilles d'Artichaut, nous avons traité de la cynaropicrine pure par une solution de carbonate de sodium à 10 % d'une part et par une solution

d'hydroxyde de sodium (N) d'autre part. Le premier traitement correspond à la méthode décrite ci-dessus, dont il convient de vérifier l'éventuelle action sur la cynaropicrine, le second l'hydrolysant à coup sûr.

Après avoir abandonné ces liqueurs alcalines pendant 24 heures, puis décoloré à l'aide de noir animal, ces dernières sont amenées à pH 1,5 par addition d'acide chlorhydrique concentré. L'extraction est ensuite réalisée comme précédemment.

Ces deux extraits sont comparés en C.C.M.. L'extrait obtenu après hydrolyse alcaline par l'hydroxyde de sodium (N) fournit une tache de Rf 0,50 correspondant à l'H.M.A., mais l'extrait obtenu après addition de carbonate de sodium ne donne aucun spot. Ceci prouve que le milieu carbonaté n'est pas assez alcalin pour saponifier la cynaropicrine. Par conséquent, la technique d'extraction au chlorure de méthylène extrait bien l'H.M.A. libre de la plante.

Il convient donc d'ajouter à la liste des acides et acides-alcools isolés de l'Artichaut, l'H.M.A. libre qu'il contient également.

VII - SYNTHESE ET CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ACIDE α -HYDROXYMETHYL ACRYLIQUE ; COMPARAISON AVEC LE CORPS ISOLE DANS L'EXTRAIT D'ARTICHAUT

1) - Synthèse de l'H.M.A.

La synthèse de l'acide α -hydroxyméthylacrylique a été réalisée par ROSENTHAL (1963). Ce composé acrylique est

obtenu suivant la technique résumée ci-dessous.

Le mélange réactionnel est composé de nickel carbonyle et d'acide propargylique en présence d'éthanol et d'acide acétique. En fin de réaction, le mélange est acidifié à pH 2,5 à l'aide d'acide chlorhydrique, et le corps est extrait à plusieurs reprises par l'éther. Les solutions étherées sont réunies, évaporées sous pression réduite, puis le composé organique est distillé à 110°C.

2° - Caractères physico-chimiques

Le corps ainsi synthétisé a un point d'ébullition de 110°C et son indice de réfraction de 1,4748. L'analyse élémentaire nous fournit les résultats suivants : carbone 47,31 %, hydrogène 5,76 % et oxygène 46,93 % pour un poids moléculaire de 98 déterminé par protométrie.

Les valeurs théoriques calculées pour un poids moléculaire de 102 sont les suivantes : carbone 47,06, hydrogène 5,92 % et oxygène 47,02 %.

Ces résultats permettent ainsi d'établir la formule brute de ce composé qui serait : $C_4H_6O_3$. La formule développée a pu être déterminée grâce aux spectres infra-rouges et de résonance magnétique nucléaire, dont nous donnons à titre indicatif les valeurs trouvées.

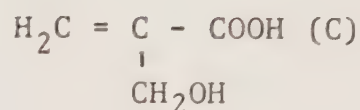
Spectre infra-rouge

bandes à 955 cm^{-1}
 1 635 cm^{-1}
 1 705 cm^{-1}
 2 600 cm^{-1}
 3 300-3 400 cm^{-1}

Résonance magnétique nucléaire

solvant CDCl_3
 4,3 p.p.m. (2 protons) = b
 5,88 p.p.m. (1 proton)
 6,28 p.p.m. (1 proton) = a
 7,68 p.p.m. (2 protons) = c

(a)



(b) (c)

3) - Comparaison du composé obtenu synthétiquement
 avec le corps isolé dans l'extrait d'Artichaut

Ce témoin obtenu par synthèse est comparé en C.C.M. aux extraits d'Artichaut obtenus par hydrolyse acide et sans hydrolyse préalable. Nous avons utilisé les mêmes solvants et les mêmes réactifs que précédemment. Le tableau T 9 résume les résultats obtenus. Ces derniers permettant ainsi de confirmer la présence dans ces divers extraits d'acide α -hydroxyméthyl acrylique.

TAB. (T9)

VALEURS DES Rf CORRESPONDANT A L'H.M.A. SYNTHETIQUE ET AU DERIVE ACRYLIQUE MIS EN EVIDENCE DANS L'ARTICHAUT

SUBSTANCES	SOLVANT ALCALIN			SOLVANT ACIDE	
	SOLVANT I	SOLVANT II	SOLVANT III	SOLVANT IV	
	Ethanol-Tétrahydro- furane-Ammoniaque 25 % (56-22-22 V/V)	Ethanol-Chloroforme : ammoniaque 25 % (68-15-17 V/V)	Butanone-propanol- éthanol-ammoniaque 25 % (45,5-4,5-18-32 V/V)	Toluène-Formiate d'éthyle- acide formique (50-40-10 V/V)	
REVELEUR : ACIDE CHROMOTROPIQUE					
Extrait d'Artichaut					
près hydrolyse acide	0,50	0,50	-		0,50
sans hydrolyse	0,50	0,50	-		0,50
Témoin H.M.A.	0,50	0,50	-		0,50
REVELEUR : DIPHENYL CARBAZIDE					
Composés d'addition					
Extrait d'Artichaut	-	-	0,20		0,72
près hydrolyse acide					
sans hydrolyse	-	-	0,20		0,72
Témoin H.M.A.	-	-	0,20		0,72

C H A P I T R E I I I

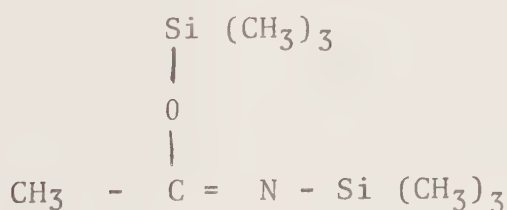
CARACTERISATION EN CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS DE L'ARTICHAUT

Il nous a été possible jusqu'ici de déceler la présence des acides glycolique, glycérique, malique et lactique, déjà signalés par BALANSARD (1952) et de mettre en évidence en outre la présence des acides citrique, succinique, fumarique et α -hydroxyméthylacrylique.

Cependant, afin de confirmer avec plus de précision la nature de ces composés et de poursuivre la mise au point des techniques analytiques de séparation et d'identification des acides-alcools, il fallait s'adresser à d'autres moyens d'investigations. Nous avons donc eu recours à la chromatographie gaz liquide (G.L.C.).

A - PREPARATION ET CHROMATOGRAPHIE DES TEMOINS

Dans les conditions opératoires utilisées, les acides témoins passent difficilement en phase vapeur ; aussi avons-nous estérifié ces composés, sous forme de dérivés silylés grâce au N, O-Bis (triméthyl silyl) acétamide (B.S.A.).



I - TECHNIQUE DE PREPARATION DES DERIVES SILYLES

Pour tous nos essais, nous avons utilisé 10 à 20 mg de témoin qui, placés dans un tube à hémolyse, sont dissous dans 2 cm³ de pyridine exempt d'eau. Après dissolution du produit, nous ajoutons 0,4 cm³ de réactif silylant B.S.A.. La préparation était ensuite abandonnée pendant 30 minutes à la température du laboratoire.

Nous avons ainsi utilisé les témoins "Merck" suivants : acide glycérique, acide glycolique, acide malique, acide citrique, acide succinique, acide fumarique, acide lactique. Quant à l'H.M.A., nous avons utilisé l'échantillon obtenu par synthèse.

II - CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES TEMOINS

1) - Conditions opératoires

- Appareil : Aerograph type 204
- Colonne : SE 30 5%, 100-120, 5', 1/8".
- Température injecteur : 225°C
- Température détecteur : 275°C
- Programme de température : 110°C-250°C à 15°/minute
- Gaz porteur : azote - débit 26 cm³/minute
- Atténuation : 128
- Déroulement de l'enregistreur : 12 mm/minute
- Volume injecté : 1 µl.

Nous avons utilisé toujours les mêmes conditions opératoires ; le volume injecté étant de 1 µl, chaque pic observé correspondait donc à 4-10 γ d'échantillons suivant la

quantité de prise d'essai témoin.

2) - Résultats

Nous avons résumé dans le tableau T 10 les temps de rétention de ces divers témoins. Quant aux enregistrements chromatographiques (fig. F 4, F 5, F 6), nous avons modifié certaines concentrations des témoins afin de voir si la sensibilité du détecteur en était affectée.

3) - Discussion

Cette méthode nous permettait, grâce aux temps de rétention de chaque produit, de séparer et d'identifier les différents esters formés à partir des témoins.

Il faut cependant apporter certaines critiques à la méthode, rendant délicat son utilisation "quantitative". En effet, à la simple lecture des enregistrements, nous nous apercevons que la réponse du détecteur varie avec la nature de l'ester. Ceci est évident pour l'acide citrique (fig. F 5, F 6).

On constate également que plus les esters d'acide sont oxygénés, et moins le détecteur est sensible, ce qui est en accord avec ce que l'on sait des mécanismes de l'ionisation des molécules organiques dans une flamme (MAZLIAK, 1966). Cependant, les différences de sensibilité du détecteur suivant le degré d'oxygénation des molécules, ne représentait pas un écueil particulier, et un dosage des différents acides pouvait être envisagé.

TAB. (T10)

TEMPERATURE DE COLONNE ET TEMPS DE RETENTION DES DERIVES SILYLES TEMOINS

DERIVES SILYLES	TEMPERATURE DE COLONNE	TEMPS DE RETENTION
glycolique	130°	1' 20"
lactique	134°	1' 40"
glycérique	138°	1' 55"
H.M.A.	155°	3'
succinique	160°	3' 25"
fumarique	166°	3' 45"
malique	187°	5' 05"
citrique	228°	7' 55"

FIG.(F4): ETUDE DES TEMOINS

Injection : 1 μ l
 Colonne : SE 30 5 %
 T° Détecteur : 275° C
 T° Injecteur : 225° C
 Programme de T° : 110°-250° (15°/mn)
 Déroulement : 12 mm/mn
 Gaz vecteur : Azote
 Débit : 26 cm³/mn
 Atténuation : 128

TEMOINS

- 1 - Acide glycolique 4 γ
- 2 - Acide lactique 6 γ
- 3 - Acide glycérique 6 γ
- a { Impuretés du témoin glycérique
- b {

Temps en mn

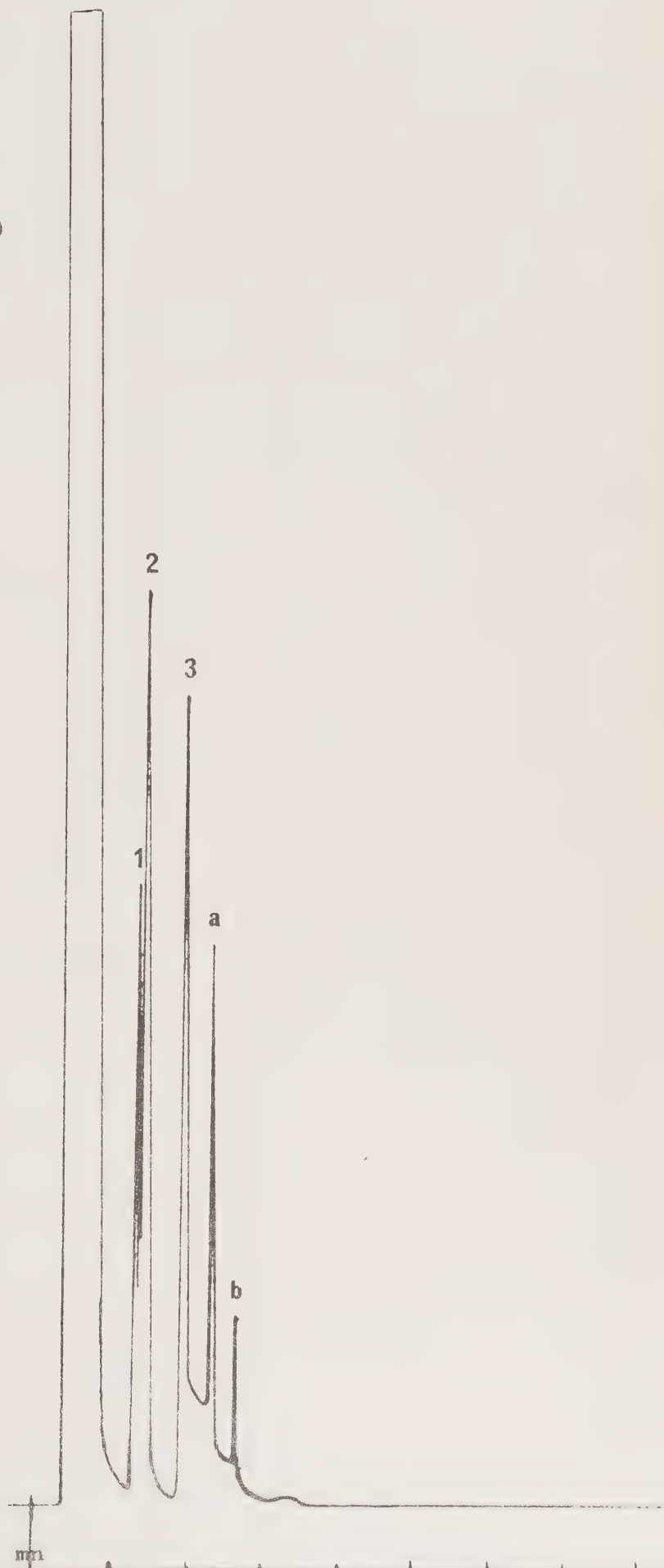


FIG.(F5) : ETUDE DES TEMOINS

Injection : 1 μ l
Colonne : SE 30 5 %
T° Détecteur : 275° C
T° Injecteur : 225° C
Programme de T° : 110°-250° (15°/mn)
Déroulement : 12 mm/mn
Gaz vecteur : Azote
Débit : 26 cm³/mn
Atténuation : 128

TEMOINS

- 1 - Acide lactique 8 γ
- 2 - Acide α -hydroxyméthylacrylique 5 γ
- 3 - Acide citrique 10 γ

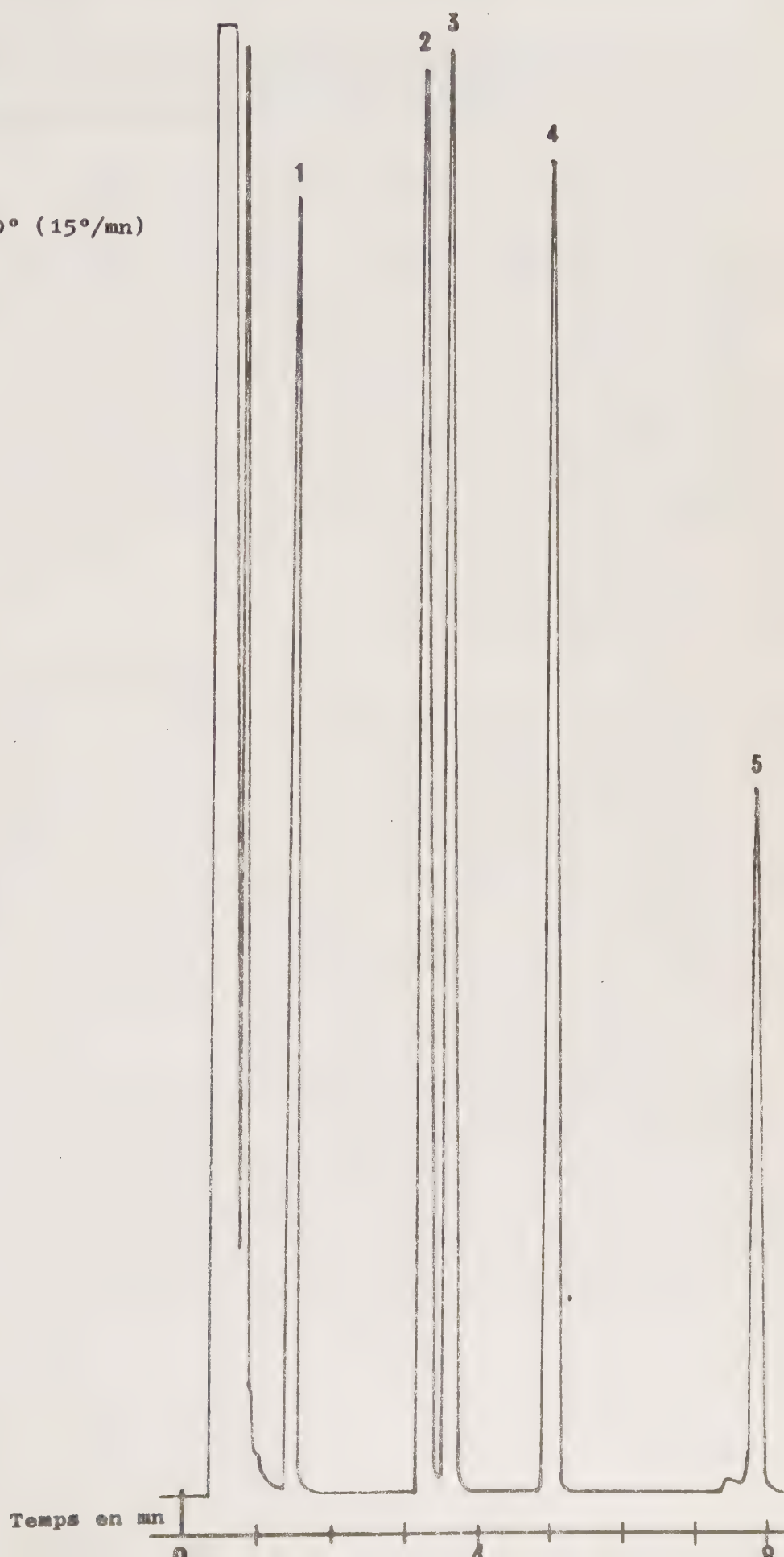


FIG.(F6): ETUDE DES TEMOINS

Injection : 1 μ l
Colonne : SE 30 5%
T° Détecteur : 275° C
T° Injecteur : 225° C
Programme de T° : 110°-250° (15°/mn)
Déroulement : 12 mm/mn
Gaz vecteur : Azote
Débit : 26 cm³/mn
Atténuation : 128

TEMOINS

- 1 - Acide lactique 8 γ
- 2 - Acide succinique 10 γ
- 3 - Acide fumarique 10 γ
- 4 - Acide malique 10 γ
- 5 - Acide citrique 10 γ



B - PREPARATION ET ANALYSE DES ECHANTILLONS D'ARTICHAUT

I - PREPARATION ET CHROMATOGRAPHIE DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT OBTENU APRES HYDROLYSE ALCALINE

1) - Conditions opératoires

L'extrait d'Artichaut est débarrassé du butanol par distillation sous pression réduite. Sur 0,5 cm³ de cet extrait, nous ajoutons 2 cm³ de pyridine exempt d'eau et 0,4 cm³ de B.S.A. afin d'obtenir les dérivés silylés des éventuels constituants acides-alcools de cet extrait. Nous avons opéré avec le même type d'appareil que précédemment et dans les mêmes conditions.

2) - Résultats

Dans ces conditions, nous obtenions 5 pics nets pour une atténuation de sensibilité de l'appareil égale à 128, et 3 autres pics pour une atténuation de sensibilité de 64, après injections de 2 µl de la solution. Ces 8 pics avaient des temps de rétention et des températures de colonne pratiquement identiques à celles des témoins. Ces résultats sont consignés dans le tableau T 11.

Les légères différences constatées nous obligeaient à apporter plus de rigueur à cette confirmation. Aussi avons-nous utilisé des témoins internes : dans ces conditions, aucun pic n'était dédoublé, ce qui nous permettait de confirmer la présence des 8 acides-alcools sans aucune ambiguïté.

TAB. (T11)

COMPARAISON DES TEMPERATURES DE COLONNE ET DES TEMPS DE RETENTION
DES TEMOINS SILYLES ET DE L'EXTRAIT D'ARTICHAUT

DERIVES SILYLES DES TEMOINS	TEMPERATURE DE COLONNE	TEMPS DE RETENTION
glycolique	130°	1' 20"
lactique	134°	1' 40"
glycérique	138°	1' 55"
H.M.A.	155°	3'
succinique	160°	3' 25"
fumarique	166°	3' 45"
malique	187°	5' 05"
citrique	228°	7' 55"

DERIVES SILYLES DE L'EXTRAIT D'ARTICHAUT	TEMPERATURE DE COLONNE	TEMPS DE RETENTION
pic n° 1	130°	1' 20"
pic n° 2	132°	1' 30"
pic n° 3	138°	1' 55"
pic n° 4	154°	3'
pic n° 5	158°	3' 20"
pic n° 6	163°	3' 40"
pic n° 7	185°	5'
pic n° 8	227°	7' 50"

3) - Discussion

La lecture de l'enregistrement (fig. F 7) montre que chaque pic correspond respectivement à l'acide glycolique pour le pic n° 1, à l'acide lactique pour le pic n° 2, à l'acide glycérique pour le pic n° 3, à l'H.M.A. pour le pic n° 4, à l'acide succinique pour le pic n° 5, à l'acide fumarique pour le pic n° 6, à l'acide malique pour le pic n° 7, à l'acide citrique pour le pic n° 8.

Nous pouvons également constater que les acides glycérique, α -hydroxyméthylacrylique et citrique sont en proportion plus faibles. En effet, c'est à une sensibilité beaucoup plus grande que s'effectue leur détection.

Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec la chromatographie sur couche mince : par cette technique, il avait été plus difficile de mettre en évidence les acides citrique et glycérique en raison de leur faible quantité.

Cependant, pour vérifier avec plus de précision les recoupements possibles entre les diverses techniques de C.C.M. et de G.L.C. des composés, nous avons séparé les divers constituants acides-alcools de l'Artichaut par chromatographie préparative.

4) - Comparaison des résultats obtenus par C.C.M. et G.L.C.

On utilise la même technique que précédemment. Des plaques de verre de 20 x 20 cm sont recouvertes de Silicagel G (Merck) d'une épaisseur de 0,75 mm. Puis, après avoir fait des dépôts de 100 μ l, la migration est assurée par le solvant acide constitué par du toluène-formiate d'éthyle-acide formi-

FIG.(F7) : EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT APRES HYDROLYSE ALCALINE

Injection : 2 μ l

Colonne : SE 30 5 %

T° Détecteur : 275° C

T° Injecteur : 225° C

Programme de T° : 110°-250° (15°/mn)

Déroutement : 12 mm/mn

Gaz vecteur : Azote

Débit : 26 cm³/mn

Atténuation : 128-64

1 - Acide glycolique (at. = 64)

2 - Acide lactique (at. = 128)

3 - Acide glycérique (at. = 64)

4 - Acide α hydroxyméthylacrylique
(at. = 64)

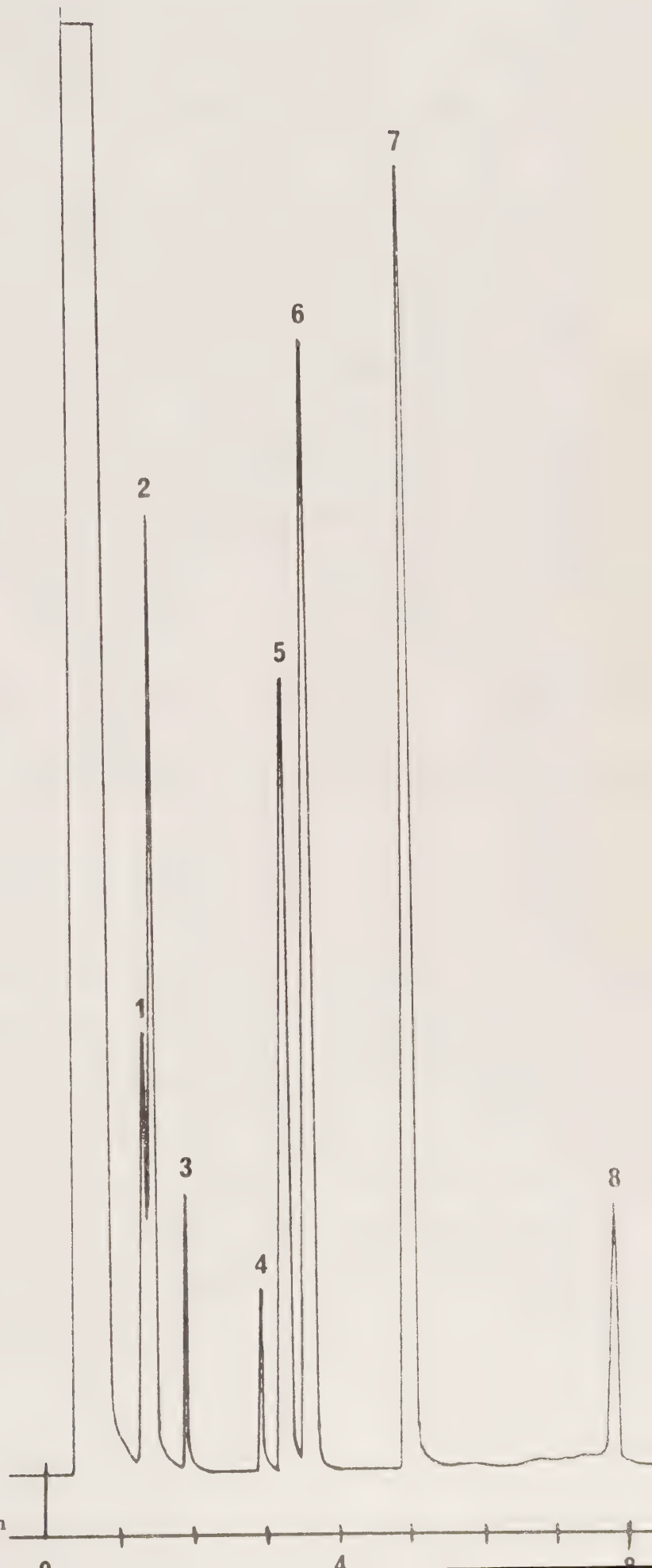
5 - Acide succinique (at. = 128)

6 - Acide fumarique (at. = 128)

7 - Acide malique (at. = 128)

8 - Acide citrique (at. = 128)

Temps en mn



que (50-40-10 V/V). Après une migration suffisante et repérage des spots, ces derniers sont recueillis après grattage du silicagel G dans un petit tube à hémolyse, puis élués à l'aide d'éthanol.

Après avoir éliminé l'alcool sous pression réduite, les divers composés recueillis grâce à la technique de chromatographie préparative sont alors silylés puis chromatographiés en utilisant la technique décrite précédemment.

On retrouve dans ces conditions, les différents pics figurant sur l'enregistrement précédent (fig. F 7). Toutefois, il faut signaler que la détection en était plus difficile. Il était en effet obligatoire de travailler à une sensibilité plus grande, compte tenu des pertes résultant des diverses éluations et par conséquent de la faible concentration des composés. Cependant, grâce à cette méthode, on recoupe parfaitement les deux techniques, nouvelle confirmation de nos résultats.

Il faut également remarquer que l'isolement et la caractérisation de l'acide α hydroxyméthylacrylique, par cette méthode, est pratiquement impossible. Ce fait est aussi en accord avec les résultats obtenus par la C.C.M. de l'extrait butanolique d'Artichaut après hydrolyse alcaline ; seule l'hydrolyse acide nous permettait de caractériser cet acide toujours absent des extraits obtenus par hydrolyse alcaline. Aussi, afin de confirmer sa présence, avons-nous soumis l'extrait butanolique de Cynara scolymus (L.), obtenu après hydrolyse acide, à la chromatographie gaz-liquide.

II - PREPARATION ET CHROMATOGRAPHIE DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT OBTENU APRES HYDROLYSE ACIDE

1) - Conditions opératoires

Nous avons débarrassé l'extrait d'Artichaut ainsi obtenu de l'excès de butanol ; puis nous avons silylé 0,5 cm³ de ce résidu par le réactif N-0 Bis (Triméthyl silyl) acétamide ou B.S.A..

Les dérivés silylés obtenus sont ensuite chromatographiés avec le même type d'appareil que précédemment et dans les mêmes conditions.

2) - Résultats

On obtient des résultats qualitatifs identiques aux précédents (fig. F 7). En effet, on observe 8 pics dont les températures de colonne et les temps de rétention correspondent aux témoins ; mais la hauteur des pics, et par conséquent leur surface, est différente (fig. F 8).

3) - Discussion

Ces résultats appellent plusieurs réflexions.

Tout d'abord, la forte proportion d'acide α hydroxyméthylacrylique par rapport au taux trouvé lors de l'extraction après hydrolyse alcaline est surprenante. Bien que ceci soit en accord avec les résultats obtenus par la chromatographie en couche mince, il semblait assez curieux que la saponification de la cynaropicrine par une base soit moins complète que par un acide. Il était donc possible d'envisager soit une combinaison en milieu basique de cet acide-alcool

FIG.(F8) : EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT APRES HYDROLYSE ACIDE

Injection : 2 μ l

Colonne : SE 30 5 %

T° Détecteur : 275° C

T° Injecteur : 225° C

Programme de T° : 110°-250° (15°/mn)

Déroutement : 12 mm/mn

Gaz vecteur : Azote

Débit : 26 cm³/mn

Atténuation : 128-64

- 1 - Acide glycolique (at. = 64)
- 2 - Acide lactique (at. = 128)
- 3 - Acide glycérique (at. = 64)
- 4 - Acide α -hydroxyméthylacrylique
(at. = 64)
- 5 - Acide succinique (at. = 128)
- 6 - Acide fumarique (at. = 128)
- 7 - Acide malique (at. = 128)
- 8 - Acide citrique (at. = 128)

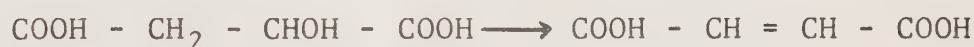
Temps en mn



avec un ou plusieurs composés, soit sa destruction partielle.

Parallèlement à l'augmentation de l'acide α hydroxyméthylacrylique dans les extraits acides, on constate une diminution de l'acide fumarique après hydrolyse acide. Ce fait curieux avait déjà été constaté précédemment, lors de la séparation des composés acides-alcools de l'Artichaut par C.C.M. après hydrolyse acide.

Il est cependant possible de donner à ce résultat, apparemment aberrant, une explication. En effet, l'Artichaut contenant de l'acide malique en assez grande quantité, ce dernier pourrait être déshydraté en milieu alcalin et donner de l'acide fumarique par la réaction suivante :



Cette hypothèse, qui a pu être confirmée expérimentalement et mise en évidence par la C.C.M. après hydrolyse de l'acide malique par la soude Na, ébullition et révélation par les réactifs classiques, sera réexaminée plus en détail ci-dessous.

III - PREPARATION ET CHROMATOGRAPHIE DE L'EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT OBTENU SANS HYDROLYSE PREALABLE

1) - Conditions opératoires

L'extrait d'Artichaut, ainsi obtenu, est débarrassé de l'excès de butanol par évaporation sous pression réduite puis, après silylation de 0,5 cm³ de cet extrait, par le réactif B.S.A. suivant la méthode décrite, on soumet cette prépa-

ration à la chromatographie dans les mêmes conditions que précédemment.

2) - Résultats

Des résultats qualitatifs comparatifs aux précédents sont ainsi obtenus (fig. F 9). En effet, on observe 8 pics dont les températures de colonne et les temps de rétention correspondent aux témoins. Cependant, certains pics ont des hauteurs différentes et par conséquent leur surface n'est pas identique aux précédentes.

3) - Discussion

La lecture du chromatogramme montre que chaque pic correspond respectivement aux acides précédemment décrits. Cependant, il faut noter que la concentration en acide dans cet extrait est plus importante.

En effet, l'atténuation de l'appareil doit être amenée à 254 pour que les hauteurs de pic puissent se comparer aux précédentes. Cette concentration en acide résulte, sans nul doute, du meilleur rendement d'extraction sans hydrolyse préalable. Ces résultats sont donc en parfait accord avec ceux obtenus en C.C.M., seules les variations des taux d'acides sont observées avec plus de précision grâce à la G.L.C..

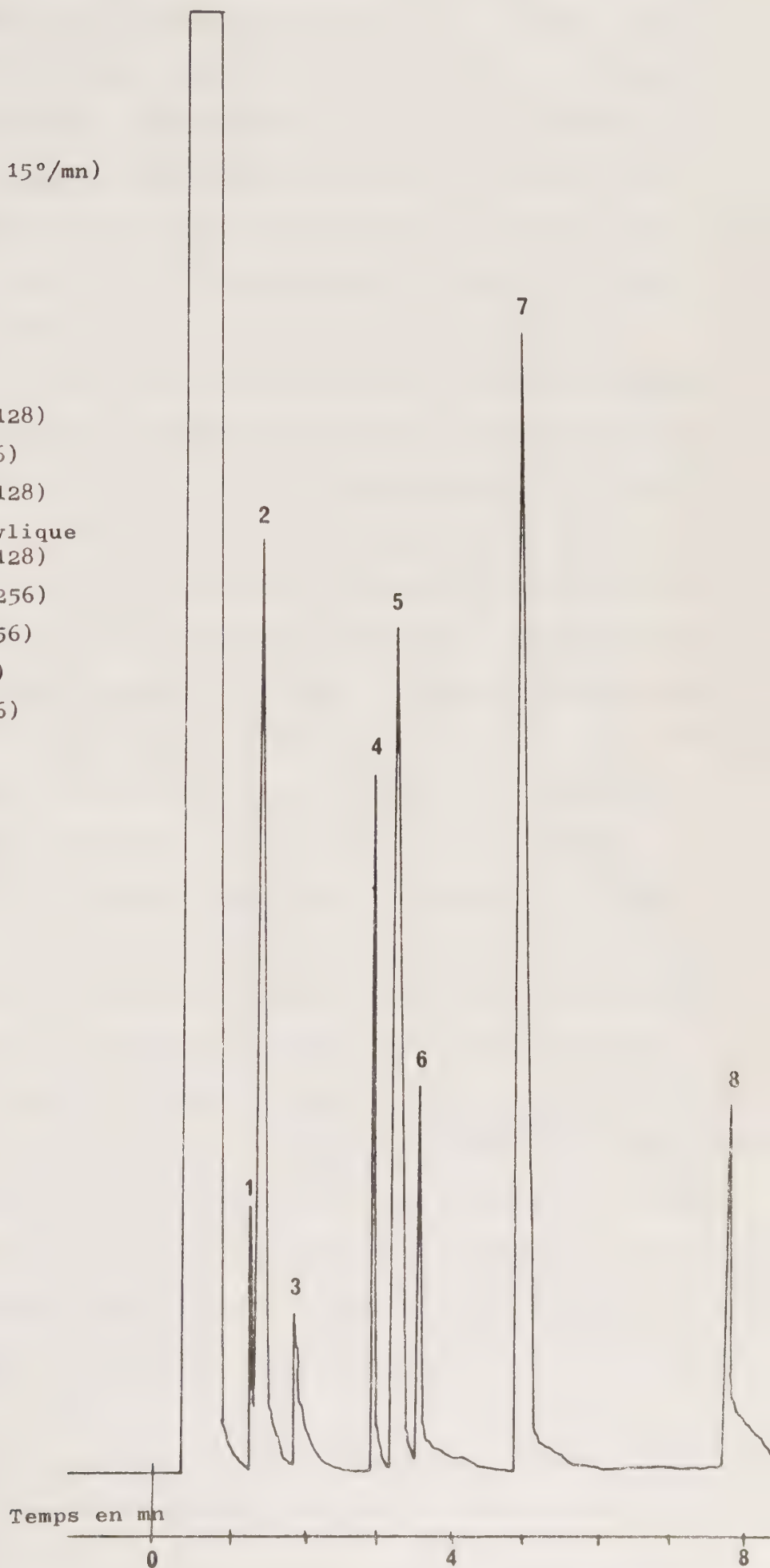
C - DISCUSSION GENERALE DES METHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE QUALITATIVE

La méthode d'extraction par le méthanol acide est donc celle que nous préconisons et que désormais nous appliquerons, tant pour l'Artichaut que pour d'autres plantes étudiées pour leur teneur en acides et acides-alcool (voir 3ème partie).

FIG.(F9): EXTRAIT BUTANOLIQUE D'ARTICHAUT SANS HYDROLYSE

Injection : 2 μ l
Colonne : SE 30 5 %
T° Détecteur : 275° C
T° Injecteur : 225° C
Programme de T° : 110°-250° (15°/mn)
Déroulement : 12 mm/mn
Gaz vecteur : Azote
Débit : 26 cm³/mn
Atténuation : 256-128

- 1 - Acide glycolique (at. : 128)
- 2 - Acide lactique (at. : 256)
- 3 - Acide glycérique (at. : 128)
- 4 - Acide α hydroxyméthylacrylique
(at. : 128)
- 5 - Acide succinique (at. : 256)
- 6 - Acide fumarique (at. : 256)
- 7 - Acide malique (at. : 256)
- 8 - Acide citrique (at. : 256)



Si dans nos travaux préalables nous avons vérifié les conséquences des hydrolyses alcalines ou acides, c'est parce que nous avons entrepris notre travail en étudiant un extrait d'Artichaut, spécialisé sous le nom de CHOPHYTOL, et qui est précisément obtenu après hydrolyse alcaline. Or, il apparaît en fait qu'une simple extraction en milieu acide suffit à libérer les acides éventuellement combinés à l'état de sel et à en permettre une extraction convenable.

En effet, grâce à cette méthode, la purification de l'extrait d'Artichaut requiert une quantité moindre de charbon actif et de ce fait les acides et acides-alcools sont moins adsorbés. Cette technique n'a pas la prétention d'avoir un rendement supérieur à celle utilisée après hydrolyse alcaline ou acide mais, de par sa simplicité, limite les risques d'erreurs lors des éventuels dosages. De même, l'absence d'hydrolyse préalable réduit en outre ces risques de trouver dans les extraits des artefacts de préparation ou des produits de dégradation qui pourraient interférer lors des études analytiques.

Et ceci d'autant plus que les mélanges d'acides et d'acides-alcools sont peu stables, nos expériences nous ayant prouvé qu'après un séjour prolongé, à la température du laboratoire, diverses modifications chimiques se produisaient, modifiant l'allure des chromatogrammes. Aussi convient-il d'opérer toujours sur des extraits fraîchement préparés, qu'on évitera de conserver trop longtemps, et qui devront être maintenus, dans ce cas, à 4°C et à l'abri de la lumière ; on peut également salifier ces extraits acides par une solution de bicarbonate afin d'éviter d'éventuelles estérifications ou combinaisons.

En prenant toutes ces précautions, les méthodes de séparation et d'identification par C.C.M. donnent des résultats

tout à fait satisfaisants. En revanche, il n'en est pas de même des tentatives de fractionnement effectuées sur colonne (TAVANT et coll., 1965) ; en effet le protocole proposé par ces auteurs ne nous a pas donné de résultats convaincants et la méthode qu'ils indiquent exigerait une expérimentation plus poussée. Quant à la G.L.C., elle permet une bonne séparation des acides et acides-alcools et une identification aisée grâce à des témoins traités dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus par G.L.C. confirment étroitement les indications fournies par la C.C.M.. Cependant cette méthode plus délicate nous obligeait à travailler sur des dérivés silylés.

Nous pensions utiliser la méthode chromatographique par G.L.C. pour effectuer le dosage des acides et acides-alcools dans les extraits butanoliques d'Artichaut ; or il s'est avéré qu'une telle méthode de dosage se heurtait à de très nombreuses difficultés.

Travaillant sur des dérivés silylés et non plus sur les corps organiques initiaux, de nouvelles sources d'erreurs pouvaient intervenir. En effet, l'estérification n'est pas toujours complète, car la cinétique de ces réactions varie avec la nature de l'alcool, et l'encombrement stérique des molécules.

Aussi, afin de tenter le dosage des différents acides et acides-alcools de l'extrait d'Artichaut, il était obligatoire de doser chaque acide séparément en le comparant à une gamme étalon établie pour chaque acide et obtenue dans des conditions très strictes de température et de délai d'estérification.

Malheureusement ces gammes étalons n'étaient jamais reproductibles et la relation entre la surface des pics chroma-

tographiques et les quantités croissantes des divers composés organiques témoins, n'était pas alignée sur une droite, ce qui rendait le dosage impossible.

Une autre difficulté apparaissait également : le détecteur s'encrassait rapidement après injection des dérivés silylés de sorte que la sensibilité en était affectée. Il aurait donc été souhaitable d'utiliser les méthodes classiques de méthylation par le méthanol trifluorure de bore et le diazométhane pour tenter ces dosages.

A ces méthodes classiques par G.L.C., nous avons tenté d'y substituer une technique colorimétrique (SNELL et SNELL, 1961). Malheureusement ces techniques n'ont jamais pu nous fournir de résultats reproductibles, notamment en raison de la complexité des opérations et aussi de la complexité des mélanges d'acides, interférant entre eux au cours de laborieuses opérations de séparation. De sorte que, nous avons été, une fois encore, contraints d'abandonner ces tentatives de dosage, après de multiples et infructueux essais.

Nous avons finalement appliqué aux extraits d'Artichaut une méthode de dosage enzymatique (BOGAERT et coll., 1972), qui nous a fourni des résultats satisfaisants et reproductibles, tout au moins pour certains des acides présents dans la plante.

C H A P I T R E I V

DETERMINATIONS QUANTITATIVES PAR VOIE ENZYMATIQUE

A - TECHNIQUES UTILISEES

I - EXTRACTION DES ACIDES-ALCOOLS

La technique d'extraction des acides-alcools est celle utilisée précédemment.

20 g de plantes sèches placées dans un broyeur et additionnées de 250 cm³ de méthanol acide, sont agitées pendant 15 minutes. Après filtration, les liqueurs méthanoliques sont évaporées sous pression réduite. Le résidu repris par de l'eau distillée est alcalinisé à pH 8 puis décoloré par le noir animal. Ces liqueurs sont ensuite lyophilisées. Ce lyophilisat, placé sous vide en ampoules scellées, constitue le matériel d'étude.

II - DOSAGE DE LA MATIERE ORGANIQUE

Des parties aliquotes de lyophilisat sont calcinées à 500°C de façon à apprécier la quantité de matière organique retirée des échantillons. Ainsi, les feuilles sèches d'artichaut, après extraction au méthanol acide, fournissent 11,4 g de matière organique pour cent grammes de drogue sèche.

III - DETERMINATION ENZYMATIQUE

La technique utilisée est celle décrite par HOHORST et SIEBERT (1963).

Nous résumons dans le tableau T 12 les réactions enzymatiques mises en oeuvre pour le dosage de trois acides, dont les enzymes correspondantes sont commercialisées.

En ce qui concerne le dosage de l'acide citrique, il s'effectue en deux étapes, faisant intervenir successivement deux enzymes : l'aconitase et l'isocitrate déshydrogénase.

Le NADH ou NADPH, formé à l'issue des réactions, est évalué par spectrophotométrie à 340 nm ; les mesures de variation des D.O. sont représentatives des quantités d'acides engagées dans ces réactions. Nous avons effectué trois dosages dont la moyenne nous a permis de calculer les quantités d'acides lactique, malique et citrique par rapport à un étalon.

B - RESULTATS

Les taux en acides malique, citrique et lactique sont exprimés en mg pour 100 g de drogue sèche. Nous avons exprimé par la lettre Σ la somme de ces 3 acides en mg pour 100 g de plante sèche.

Les résultats sont les suivants :

- acide malique : 1 220,0mg
- acide citrique : 4,95 mg
- acide lactique : 19,20 mg

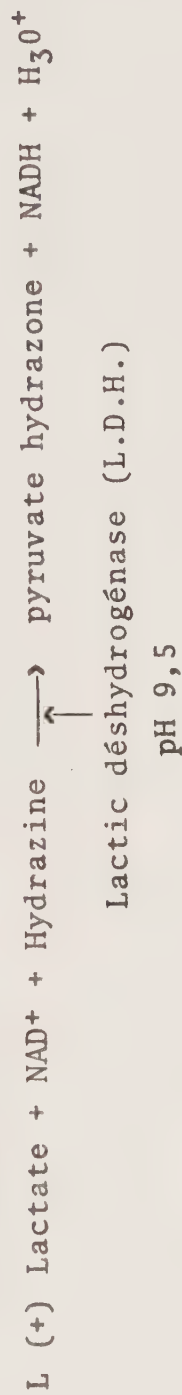
somme des 3 acides (Σ) = 1 224,15 mg soit 1,22 g % de feuilles sèches.

Cette valeur est à rapprocher des 11,4 g % de matières organiques extraites par le méthanol acide : on voit que ces trois acides représentent environ 11 % de ces matières organiques.

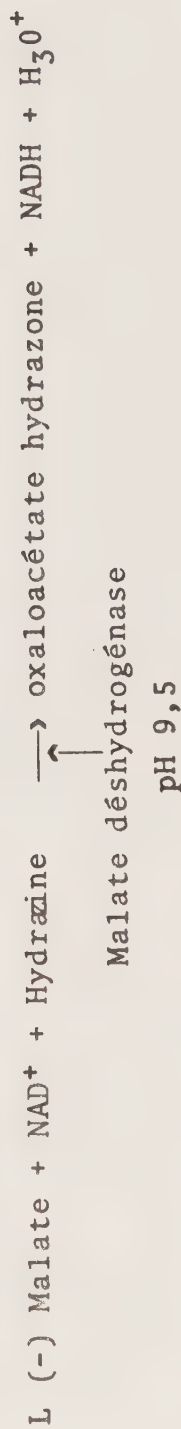
TAB. (712) REACTIONS ENZYMATIQUES MISES EN OEUVRE

POUR LA DETERMINATION DES ACIDES LACTIQUE, MALIQUE ET CITRIQUE

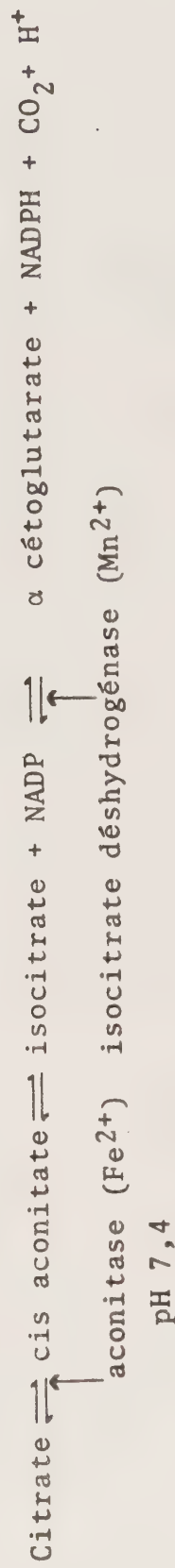
1) - Acide lactique



2) - Acide malique



3) - Acide citrique



C - DISCUSSION

Si les dosages enzymatiques méritent toute notre confiance par leur spécificité et leur précision, il semble bien qu'il existe dans le matériel végétal des composés parasites inhibiteurs de certaines enzymes. L'exemple nous en est fourni dans le cas de l'Artichaut.

En effet, nous avons tenté de déterminer le taux d'acide succinique par voie enzymatique. Les dosages se sont révélés négatifs, bien que la présence de ce corps organique ait été mise en évidence par les différentes techniques chromatographiques. Or, il s'est avéré que l'H.M.A. est inhibiteur de la succinyldéshydrogénase (BOGAERT, 1972)*, rendant ainsi le dosage impossible.

Seuls, en définitive, les acides lactique, malique et citrique peuvent être dosés par ces méthodes enzymatiques qui ne permettent donc pas de déterminer la composition pondérale exacte du bloc acide.

Ajoutons que ces techniques décrites pour les sérums animaux, ne sont donc pas toujours applicables au matériel végétal sans certaines restrictions. D'une part la préparation de ce matériel réclame des purifications très soigneuses, afin d'éliminer les pigments.

De plus, nous ne disposons pas naturellement d'une méthode de dosage enzymatique de l'H.M.A., cet acide n'étant pas un métabolite habituel de la cellule.

* Communication personnelle.

Quant aux acides glycolique et glycérique, la difficulté de leur dosage réside dans le fait que les enzymes correspondantes ne sont pas commercialisées, et que leur obtention à partir de matériel vivant pose de délicats problèmes car ils sont rares dans le règne animal et fort mal répertoriés dans le règne végétal.

Par ailleurs, il est difficile de prévoir a priori la dilution correcte permettant une activité maximum de l'enzyme, et de soupçonner une inhibition enzymatique par tel ou tel composé organique. Seule l'expérimentation, comme ce fut le cas ici pour l'acide succinique dont l'enzyme est inhibé par l'H.M.A., permet de détecter de telles inhibitions.

Néanmoins, cette méthode analytique par voie enzymatique peu utilisée en phytochimie, nous permet de doser avec une précision satisfaisante un certain nombre de composés acides, dont il convient maintenant d'envisager les propriétés pharmacologiques, afin d'apprécier leur rôle dans les effets hépatorénaux des extraits d'Artichaut.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE PHARMACOLOGIQUE

DES EXTRAITS D'ARTICHAUT

C H A P I T R E I

INTRODUCTION ET RAPPEL HISTORIQUE

La décoction de feuilles d'Artichaut était employée en médecine populaire au 19^e siècle comme diurétique et contre les maladies du foie. C'est à la suite des travaux de BREL (1930), qui constata son efficacité dans les ictères, et de CHABROL et coll. (1931) qui mirent en évidence ses propriétés cholérétiques énergiques, que la plante entra dans la médecine officielle. Les préparations d'Artichaut auraient également la propriété d'augmenter la fonction uréogénique du foie (TIXIER et coll., 1934), (PICARD, 1935), de favoriser l'élimination de l'urée urinaire (TIXIER et coll., 1934 ; PICARD, 1935 ; MONTVILLE, 1933 ; STAHL et SCHORN, 1961 ; SOKOLOVA et LYOUNBARTSEVA, 1970), d'abaisser le taux d'urée sanguine (GARROS, 1934 ; SOKOLOVA et LYOUNBARTSEVA, 1970) et de diminuer la cholestérolémie (PICARD, 1935 ; MONTVILLE, 1933 ; GARROS, 1934 ; TIXIER et coll., 1934 ; PREZIOSI et LOSCALZO, 1957).

Récemment, MAROS et coll. (1966) constatèrent que l' extrait aqueux déprotéiné de ~~feuilles~~ d'Artichaut a une influence favorable sur la régénération du foie chez les rats partiellement hépatectomisés. Le rôle détoxifiant de ces préparations a été mis en évidence sur le chien par CRUZ OTEO (1970) vis-à-vis du pentobarbital et sur la souris après injection de benzoate d'oestradiol (JONDET, 1965)*. Cette détoxification au niveau du foie serait due à la biotransformation des différents agents chimiques, celle-ci étant vraisemblablement en rapport avec les coenzymes N.A.D.P. et N.A.D.P.H₂. mis

* Communication personnelle

en évidence dans le foie de rat (JOUANY, 1965).

La Cynarine a toujours été tenue pour le principe responsable de ces activités pharmacologiques.

Il faut toutefois signaler que si l'Artichaut augmente dans des proportions importantes la diurèse et le pouvoir concentrateur du rein, la cynarine n'en semble que très légèrement responsable. En effet, les différentes expériences décrites dans la littérature n'ont permis de déceler pour cette molécule qu'une activité diurétique très inconsistante. Toutefois, comme le suggèrent PARIS et MOYSE (1971), les autres composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes, les acides caféïque et chlorogénique présents dans les feuilles d'Artichaut pourraient renforcer l'action diurétique de la cynarine. Or, l'extrait butanolique obtenu suivant les méthodes d'extraction décrites précédemment, ne contient plus ces divers composés ; il possède en revanche, comme l'étude analytique nous l'a révélé, les acides malique, citrique, succinique, glycolique, glycérique, fumarique et α -hydroxyméthylacrylique dans cet extrait. Nous avons donc entrepris l'étude pharmacologique de cet extrait et de ces acides seuls ou associés, en déterminant d'abord leur toxicité aiguë et chronique.

C H A P I T R E I I

ETUDE DES TOXICITES AIGUE ET CHRONIQUE DE L'EXTRAIT BUTANO- LIQUE D'ARTICHAUT

A - TOXICITE AIGUE*

I - PREPARATION DE L'ECHANTILLON

L'extrait d'Artichaut est débarrassé du butanol par distillation sous pression réduite et la préparation est additionnée d'une solution de bicarbonate de sodium afin de la salifier et de fixer le pH à 7.

La grande hydrosolubilité des ~~sels~~ d'acides ainsi préparés permet d'injecter des volumes réduits de solutions à des concentrations élevées et ces préparations serviront à la détermination de la DL 50.

II - DETERMINATION DE LA DL 50.

La DL 50 a donc été déterminée, par voie intra-péritonéale, chez les rats de souche Wistar, d'un poids moyen de 220 g, par la méthode de REED et HUENCH, dite des totaux cumulatifs. Des quantités croissantes de produit ont été injectées par voie intrapéritonéale à des lots de 10 animaux. Les animaux ont ensuite été surveillés pendant 15 jours ; lorsque la mort n'est pas survenue dans les 36 heures suivant l'administration, la survie a été de règle.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

* Communication personnelle (JOUANY J.M., 1970).

DETERMINATION DE LA DL 50 SELON REED ET HUENCH

Dose administrée mg/kg (voie IP)	vivants	vivants cumulés	morts	morts cumulés
400	10	25	0	0
600	8	15	2	2
800	5	7	5	7
1 000	2	2	8	15
1 200	0	0	10	25

D'après ce tableau, on s'aperçoit qu'à la dose de 800 mg/kg, il y a un nombre égal de vivants et de morts cumulés. Cette dose est donc la DL 50 qui est ainsi fixée à 800 mg/kg.

III - ASPECT CLINIQUE DES ANIMAUX

Dès les 2 ou 3 minutes suivant l'administration de doses mortelles ou voisines de la dose mortelle, apparaissent chez les animaux des incidents ventilatoires caractérisés principalement par de l'hyperpnée suivies de pauses. Les animaux s'immobilisent et semblent prostrés. Vers la 5ème minute, une vasodilatation périphérique apparaît, les oreilles des rats étant, en particulier, très rouges. Vers 10 minutes, les incidents ventilatoires se traduisent par un rythme de CHEYNES-STOKES typique. La bradypnée est ensuite très importante, on constate une moyenne de 30 ventilations par minute au lieu de 120 à 150 chez les animaux témoins.

Les animaux ont tendance à perdre l'équilibre et à tomber sur le côté, mais le décubitus latéral ne peut pas être obtenu. On constate alors une hyperthermie relative (40,1°C), une hyper-esthésie, une hyperacousie. Ensuite, un état de prostration accompagne le rythme de CHEYNES-STOKES ;

l'hypoventilation est notoire, une certaine cyanose apparaît et la mort survient généralement au bout de 12 à 36 heures. Lorsque des doses inférieures à la DL 50 sont administrées, le tableau clinique est assez voisin de celui qui a été précédemment décrit, mais chaque symptôme est beaucoup plus discret. Toutefois, 5 minutes après l'injection, on constate des phénomènes d'excitation ; la motilité est très augmentée, les animaux claquent des dents et sont agités de secousses cloniques sporadiques, accompagnant une vive réaction pilo-motrice. Puis ces phénomènes disparaissent et les animaux ne semblent en rien affectés par la suite.

Après administration d'une dose égale à la DL 50, les animaux n'ayant pas survécu, ont été autopsiés, aucune lésion macroscopique n'a pu être observée, si ce n'est un état congestif des poumons et une cyanose des organes hématopoïétiques. Chez les animaux ayant reçu des doses non mortelles, puis sacrifiés, aucune lésion n'a pu être observée.

B - TOXICITE CHRONIQUE *

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

L'étude de la toxicité chronique à moyen terme a été pratiquée lors d'administration orale. L'extrait d'Artichaut, débarrassé de butanol puis salifié, est administré au rat par intubation de 1 cm³ du produit, aux doses de 50 et 100 mg/kg, une fois par jour, 5 jours par semaine pendant 1 mois.

* Communication personnelle (JOUANY J.M., 1970).

Les lots d'animaux étaient constitués ainsi :

- un lot de 5 mâles : témoins.
- un lot de 5 femelles : témoins.
- un lot de 10 mâles : essais 50 mg/kg.
- un lot de 10 femelles : essais 50 mg/kg.
- un lot de 10 mâles : essais 100 mg/kg.
- un lot de 10 femelles : essais 100 mg/kg.

Ces animaux, après avoir reçu le produit pendant 1 mois, ont été surveillés pendant le mois suivant.

La prise de nourriture a été appréciée régulièrement, les animaux ont été pesés périodiquement, la numération et la formule sanguines ont été déterminées avant le début des administrations, toutes les semaines pendant le mois d'essais et 15 jours après l'arrêt du traitement.

II - RESULTATS

Aucune mort n'a été constatée pendant cette expérimentation, il a donc été possible d'étudier les variations de la courbe de prise de poids, de la numération globulaire et de la formule sanguine.

1) - Variations de la courbe de prise de poids

L'évolution de la prise de poids étant différente chez les mâles et les femelles, les courbes ont été établies pour les animaux de chaque sexe. Un ralentissement de la prise de poids est surtout manifeste à la dose de 100 mg/kg chez les rats mâles ; il n'y a toutefois pas amaigrissement. Les femelles paraissent moins affectées, l'évolution des courbes

de poids de chaque lot étant à peu près comparables. Après arrêt de l'administration du produit, les prises de poids deviennent tout à fait comparables.

Les figures F 10 et F 11 résument les résultats.

2) - Variations de la numération globulaire

Les animaux mâles et femelles ayant des numérations globulaires comparables ont été considérés ensemble dans le lot témoin.

a) - Globules rouges :

Aucune modification significative n'a été retrouvée ; à la dose de 100 mg/kg, une légère hyperglobulie pourrait être soupçonnée.

b) - Globules blancs :

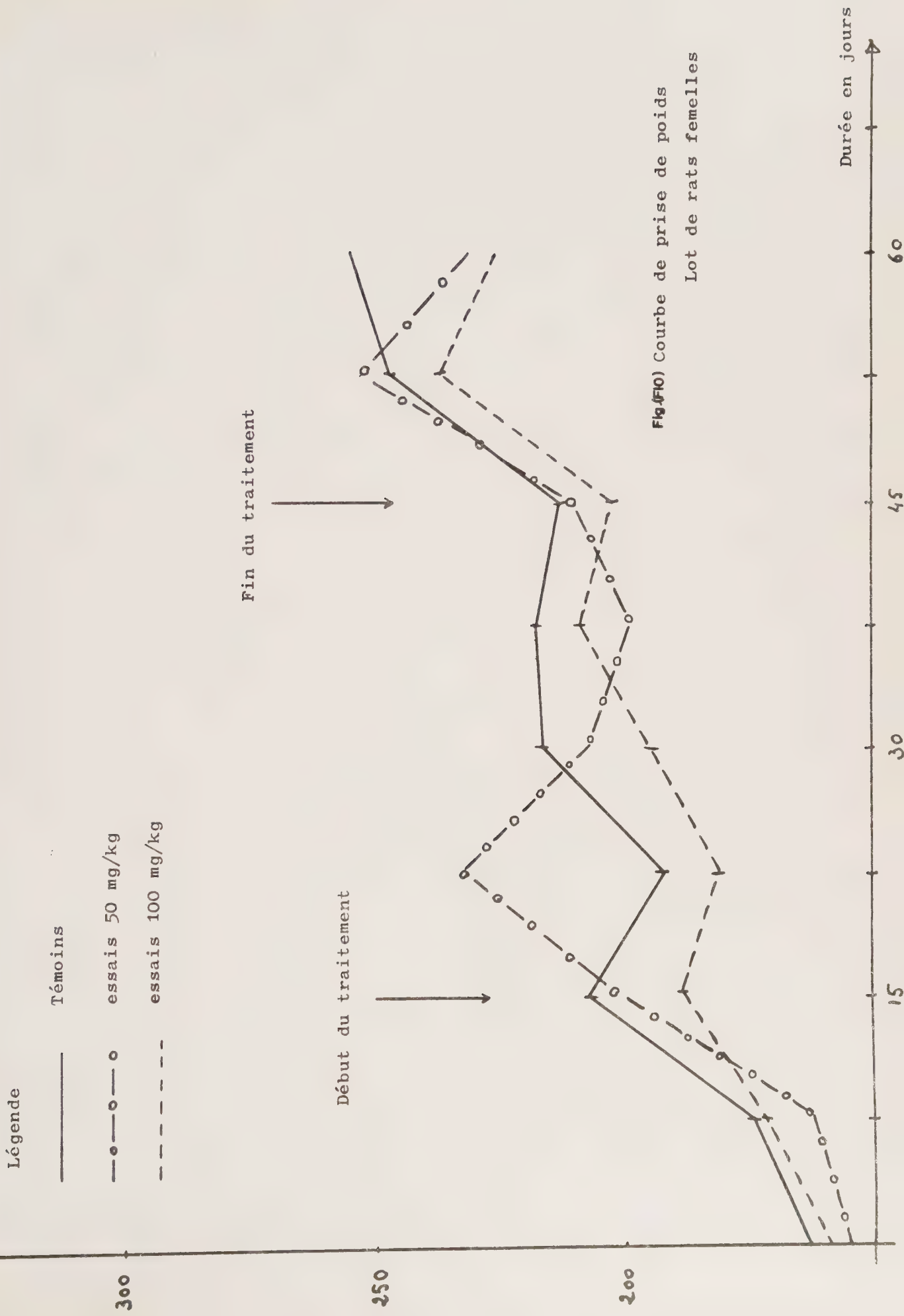
Une tendance à l'augmentation des globules blancs a été remarquée vers la fin de l'administration du produit à la dose de 100 mg/kg, aussi bien chez les mâles que les femelles, mais elle est peu significative.

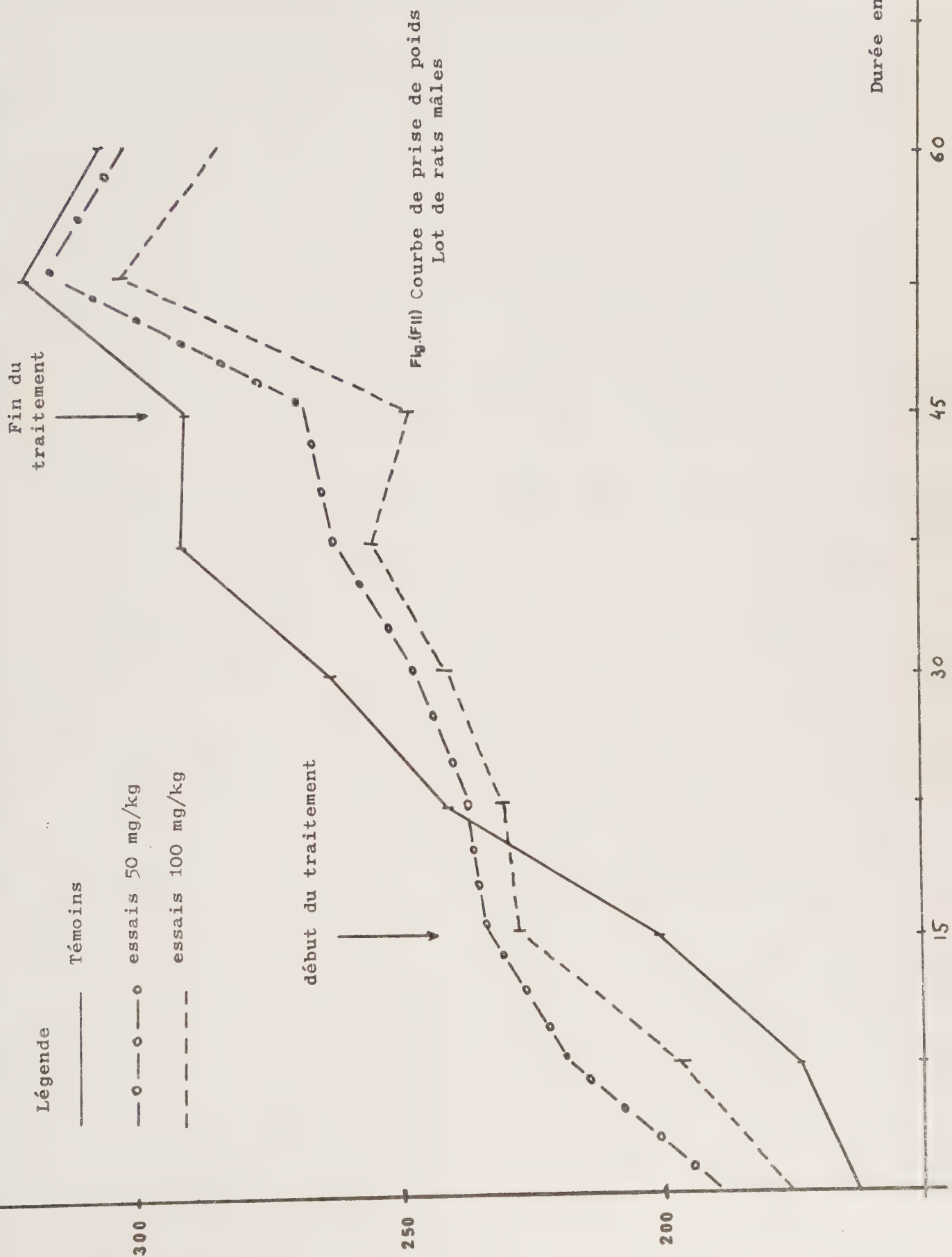
De toute façon, 15 jours après l'arrêt de l'administration du produit, les animaux des différents lots sont très comparables.

3) - Variations de la formule sanguine

Aucune modification du nombre et de l'aspect des différents éléments n'a été observée chez les animaux traités, qui sont restés comparables aux animaux témoins.

Les résultats sont exprimés dans le tableau T 13.





TAB.(T13) NUMERATION ET FORMULE LEUCOCYTAIRE CHEZ DES RATS APRES
ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE DE L'EXTRAIT SALIFIE D'ARTICHAUT

TEMOINS ESSAIS	NUMERATION		FORMULE LEUCOCYTAIRE			
	GR ($\times 10^6$)	GB ($\times 10^4$)	Neutro %	Polynucl. eosino. %	Lympho %	Mono %
Avant administration						
Témoin	8,5	1,12	24,5	2,9	71	1,5
Essais : 100 mg/kg	8,5	1,30	22	2,7	74	0,9
Essais : 100 mg/kg	8,0	1,10	23	3,1	71	1,0
Essais : 50 mg/kg	8,9	1,30	24,5	2,3	73	0,6
Essais : 50 mg/kg	8,6	1,15	24	2,2	72	1,3
=====						
2ème Semaine						
Témoin	8,6	1,1	22	3,5	72	1,5
Essais : 100 mg/kg	9,2	1,35	20	1,5	77	1,5
Essais : 100 mg/kg	7,9	1,30	27	1,5	70	2
Essais : 50 mg/kg	8,7	1,05	25	2,5	71	1,5
Essais : 50 mg/kg	8,6	1,28	28	0,5	70	1,5
=====						
4ème Semaine						
Témoin	8,75	1,2	23,5	2	72,5	2
Essais : 100 mg/kg	9,3	1,5	25	2	72	1
Essais : 100 mg/kg	10,5	1,4	27,5	3,5	67,5	1,5
Essais : 50 mg/kg	8,50	0,95	24	4	69,5	2,5
Essais : 50 mg/kg	8,8	1	21	2,5	72,5	3,5
=====						
Contrôle						
Témoin	8,65	1,16	23	1	74	2
Essais : 100 mg/kg	10	1,24	25	2,5	70	2
Essais : 100 mg/kg	8,05	1,20	24	2	72,5	1,5
Essais : 50 mg/kg	8,20	0,92	22	1	74	3
Essais : 50 mg/kg	8,7	0,98	27	2	68	3

III - DISCUSSION

Il a fallu administrer, par voie intra-péritonéale, des quantités élevées de préparations d'Artichaut, sous un faible volume, pour obtenir la mort des animaux. La DL 50, dans ces conditions, a été déterminée à 800 mg/kg.

Ceci est en parfait accord avec les DL 50 des divers acides et acides-alcools présents dans l'extrait d'Artichaut, DL 50 comprises entre 2 g/kg et 600 mg/kg (Index MERCK, 1960).

Il faut également noter que le signe clinique majeur est une bradypnée avec rythme de CHEYNES-STOKES entraînant des cyanoses importantes des animaux. L'incidence principale du produit sur la ventilation est donc manifeste.

L'administration de doses non mortelles de 50-100 mg/kg par voie orale pendant un mois n'a pas entraîné de grandes modifications des constantes de l'animal sur le plan hématologique. Un ralentissement de la prise de poids a été remarqué pour la plus forte dose ; il pourrait être en rapport avec une diminution de la prise de nourriture et une diurèse qui a semblé fort augmentée. Après l'arrêt de l'administration du produit, les animaux sont apparus parfaitement normaux.

C H A P I T R E I I I

ROLE DETOXICANT VIS-A-VIS DU PENTOBARBITAL ET DE L'ALCOOL ETHYLIQUE

A - RAPPELS EXPERIMENTAUX

Le rôle détoxicant de l'extrait d'Artichaut, mis en évidence par TIXIER en 1939, n'avait pu être attribué à aucun principe actif. Ultérieurement, cette activité détoxicante a pu être observée après administration d'un extrait purifié de Cynara, spécialisé sous le nom de CHOPHYTOL.

Cet extrait est obtenu à partir du jus de feuilles fraîches d'Artichaut qui, après hydrolyse puis décoloration par le noir animal, est lyophilisé. Cette préparation ne contenant plus ni CYNARINE, ni dérivés flavoniques, nous pouvions penser que les acides organiques qu'il contient sont, en partie du moins, responsables de l'action détoxicante.

Les observations, réalisées sur le chien et la souris, révélèrent une activité positive du CHOPHYTOL sur la diminution de la durée de la narcose induite par le PENTOBARBITAL. Les premières expériences furent réalisées sur le chien par CRUZ-OTEO (1970).

L'auteur utilise 15 chiens répartis en 3 lots qui furent anesthésiés à l'aide de PENTOBARBITAL par voie intraveineuse ; la durée de l'anesthésie est notée, puis ces mêmes chiens reçoivent 3 jours plus tard une injection de CHOPHYTOL aux doses de 1 cm³/kg pour le premier lot, 2 cm³/kg

et 3 cm³/kg pour les 2^e et 3^e lots puis, 10 minutes après, la même dose de barbiturique. Dans ces conditions, on remarque une diminution de moitié du temps d'anesthésie pour le premier lot. Cette action s'atténue pour les 2^e et 3^e lots qui reçoivent cependant des doses de CHOPHYTOL plus importantes.

Des observations analogues ont été effectuées par JONDET (1970) sur la souris. Cet auteur constata une diminution du temps de narcose induite par le PENTOBARBITAL après administration de CHOPHYTOL à la dose de 1 cm³/kg, 20 minutes avant l'injection de barbiturique.

Dans ces deux séries d'expériences, on note que l'activité la plus importante se manifeste à la dose de 1 cm³/kg, la diminution de la narcose est alors de 60 %.

B - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE DETOXICANTE

Afin de mettre en évidence l'activité détoxicante des divers acides et acides-alcools, ainsi que des extraits butanoliques d'Artichaut, nous avons d'abord appliqué la méthode utilisée par JONDET. Puis nous avons déterminé les variations de la DL 50 de l'alcool éthylique sur la souris, afin de vérifier un éventuel pouvoir protecteur vis-à-vis de cet alcool.

I - DIMINUTION DE LA DUREE DE SOMMEIL INDUITE PAR LE PENTOBARBITAL CHEZ LA SOURIS

1) - Protocole expérimental

40 souris mâles, d'un poids moyen de 30 g, ont été utilisées pour cet essai. Les animaux, répartis en 4 groupes de 10 souris, et, placés dans une enceinte à 28°, sont traités

de la manière suivante :

- groupe n° 1 : essai à 2,5 mg/kg $\hat{a}\hat{a}$

Les animaux reçoivent en injection intrapéritonéale, une solution composée d'un mélange d'acides succinique, citrique, malique et α -hydroxyméthylacrylique à la dose de 2,5 mg/kg de chaque acide dans 0,4 cm³ pour 20 g de souris. Après un délai de 20 minutes, les animaux reçoivent par la même voie une solution de PENTOBARBITAL à raison de 30 mg/kg.

Le sommeil est considéré comme installé lorsque les animaux acceptent la position en decubitus latéral ; la fin du temps de narcose est mesurée lorsque l'animal reprend son attitude normale, après trois tentatives de remise en position de decubitus.

- groupe n° 2 : essai à 6,5 mg/kg $\hat{a}\hat{a}$

Même protocole opératoire encore, en injectant cette fois à la dose de 10 mg/kg l'extrait butanolique d'Artichaut, préalablement débarrassé de butanol et salifié à l'aide d'une solution de CO₃NaH à 10 %.

- groupe n° 4 : témoin

Ce dernier groupe reçoit 0,4 cm³ pour 20 g de souris, de solution physiologique, avant l'injection de PENTOBARBITAL.

2) - Résultats

La moyenne de la durée de sommeil observée sur le groupe témoin n° 4 est de 2 495 secondes, alors que le temps de narcose pour les groupes 1, 2, 3 sont respectivement de 517 secondes, 1 120 secondes et 980 secondes. Ces résultats sont

reportés sur la figure F 12 et nous donnons, à titre indicatif, les valeurs statistiques obtenues pour le groupe n° 1 dans le tableau ci-dessous.

DUREE DE NARCOSE EN SECONDES

TEMOIN	INJECTION DU MELANGE D'ACIDE : 2mg/kg/âa
1272	870
2100	545
2640	255
3480	780
3600	360
1140	420
3120	480
3460	640
1980	540
2160	280
MOYENNE = 2495	MOYENNE = 517
VARIANCE = 822150	VARIANCE = 41162,2
ECART TYPE = 906,7	ECART TYPE = 202,8

Quotient de test : 6,73

3) - Discussion

Cette série d'observations permet de constater une diminution importante du temps de narcose induite par le PENTOBARBITAL. Cette diminution est plus importante après l'injection du mélange d'acides que celle observée après administration de CHOPHYTOL. On constate néanmoins le phénomène déjà observé par CRUZ OTEO et JONDET : l'action s'atténue lorsque les animaux reçoivent des doses plus importantes du mélange d'acides. Ceci pourrait expliquer l'activité moindre de l'extrait d'Artichaut, dont les proportions en acides malique,

FIG.(F12): DIMINUTION DU TEMPS DE NARCOSE APRES INJECTION DU MELANGE
D'ACIDES ET DE L'EXTRAIT D'ARTICHAUT

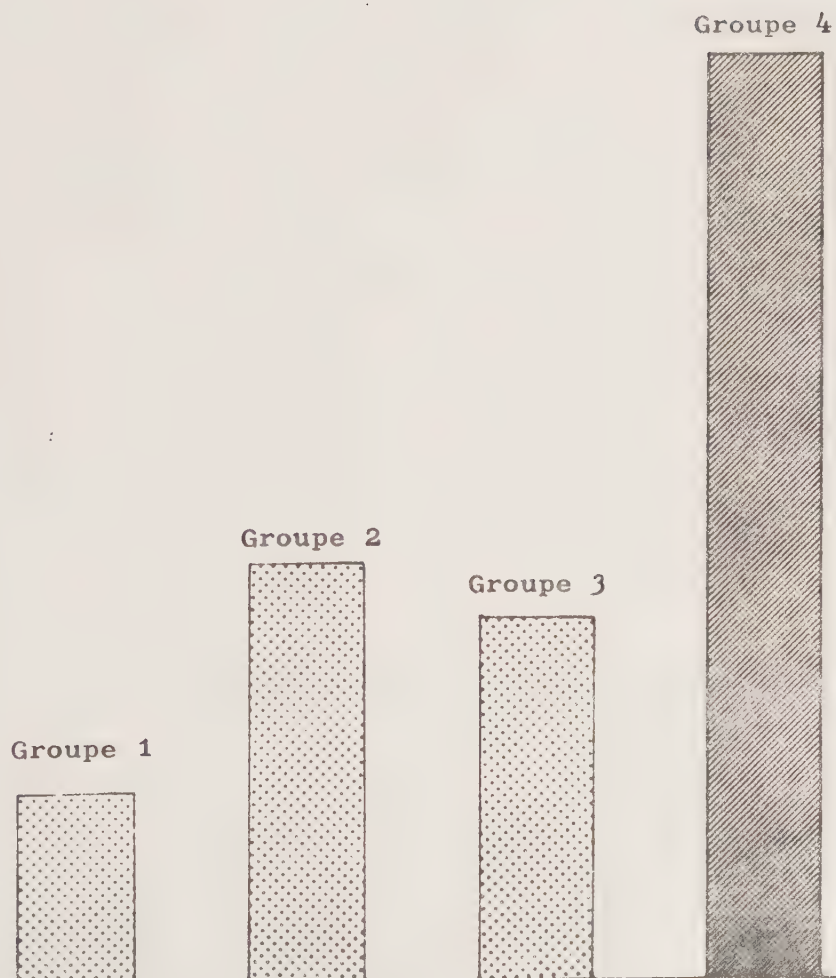
de sommeil
(secondes)

Groupe 1 : 2,5 mg/kg aa

Groupe 2 : 6,5 mg/kg aa

Groupe 3 : Extrait d'Artichaut (10 mg/kg)

Groupe 4 : Témoin



succinique, citrique et α hydroxyméthylacrylique varient considérablement.

Il faut également constater des variations importantes du temps de latence précédant le sommeil. En effet, la moyenne du temps de latence chez les animaux témoins est de 896 secondes, alors que cette moyenne n'est plus que de 672 secondes pour le groupe d'animaux protégés par le mélange des acides à la dose de 2,5 mg/kg $\tilde{a}\tilde{a}$. Le sommeil s'installe donc plus rapidement chez les animaux traités par le mélange d'acides, mais par contre la narcose semble moins profonde et dure moins longtemps.

Il est probable que, comme pour le CHOPHYTOL, ce mélange d'acides ainsi que l'extrait butanolique d'Artichaut, agissent au niveau du foie sur la biotransformation de PENTOBARBITAL en ces deux métabolites : l'acide 5-éthyl-5 (3-hydroxy-1-méthylbutyl) barbiturique et l'acide 5-éthyl-5 (3-carboxy-1-méthyl-propyl) barbiturique. L'accélération du métabolisme du PENTOBARBITAL après injection de ces acides, serait peut-être en rapport avec l'augmentation du taux des coenzymes NADP et NADPH₂ mis en évidence dans le foie de rat après traitement par le CHOPHYTOL (JOUANY, 1965).

II - VARIATION DE LA DL 50 DE L'ALCOOL ETHYLIQUE CHEZ LA SOURIS

1) - Protocole expérimental

60 souris mâles d'un poids moyen de 20 g sont utilisées pour cet essai. La DL 50 a été déterminée par voie intrapéritonéale selon la méthode de REED et HUENCH, dite des totaux cumulatifs. Des quantités croissantes d'alcool, à raison de

0,5 cm³ pour 20 g de souris, sont injectées à des lots de dix animaux. Ces derniers sont surveillés pendant 8 jours. Cependant, si la mort n'est pas survenue dans les 48 heures suivant l'administration, la survie a été de règle.

2) - Résultats

Nous avons par cette méthode déterminé la DL 50 de l'alcool éthylique exprimée en g/kg d'animal, ainsi que les variations de cette DL 50 après traitement préalable par le CHOPHYTOL, le mélange des acides et l'extrait butanolique d'Artichaut.

a) - DL 50 de l'alcool éthylique

Les résultats, consignés dans le tableau ci-dessous, permettent de fixer la DL 50 à 5,6 g d'alcool absolu par kg d'animal.

DETERMINATION DE LA DL 50 DE L'ALCOOL ETHYLIQUE

Dose en g d'alcool absolu par kg	4,8	5,2	5,6	6	6,4	6,8
Nombre de vivants	10	8	5	3	1	0
Nombre de morts	0	2	5	7	9	10
Vivants cumulés	27	17	9	4	1	0
Morts cumulés	0	2	7	14	23	30

b) - Détermination de la DL 50 de l'alcool éthylique après protection par le CHOPHYTOL

9 lots d'animaux reçoivent en intrapéritonéale 1 cm³ de CHOPHYTOL puis, 20 minutes après, une nouvelle injection d'alcool à dose croissante est pratiquée ; les morts sont comp-

tés, et la détermination de la DL 50 sera établie suivant la méthode décrite précédemment.

Dans ces conditions, on constate que la dose de 5,6 g/kg ne tue aucun animal ; la DL 50 nettement augmentée, passe alors à 7,2 g/kg. Ces résultats sont consignés dans le tableau suivant.

DL 50 APRES PROTECTION PAR LE CHOPHYTOL

Doses en g d'alcool par kg	5,6	6	6,4	6,8	7,2	7,6	8	8,4	8,8
Nombre de vivants	10	8	8	7	5	3	2	2	0
Nombre de morts	0	2	2	3	5	7	8	8	10
Vivants cumulés	45	35	27	19	12	7	4	2	0
Morts cumulés	0	2	4	7	12	19	27	34	44

c) - Détermination de la DL 50 de l'alcool éthylique après protection par le mélange d'acides

9 lots de 10 aminaux sont traités comme précédemment, mais la protection contre l'alcool est assurée par l'injection préalable du mélange d'acides à la dose de 2,5 mg/kg aa. Dans ces conditions, les résultats, exprimés dans le tableau ci-dessous, sont identiques aux précédents : la DL 50 obtenue est de 7,1 g/kg.

DL 50 APRES PROTECTION PAR LE MELANGE D'ACIDES

Doses en g d'alcool par kg	5,6	6	6,4	6,8	7,2	7,6	8	8,4	8,8
Nombre de vivants	10	9	8	6	4	3	2	2	0
Nombre de morts	0	1	2	4	6	7	8	8	10
Vivants cumulés	44	34	25	17	11	7	4	2	0
Morts cumulés	0	1	3	7	13	20	28	36	46

Nous avons représenté graphiquement sur la figure F 13 les résultats obtenus sans et après protection par le mélange des acides succinique, malique, citrique et α hydroxyméthylacrylique à la dose de 2,5 mg/kg aa.

d) - Détermination de la DL 50 de l'alcool éthylique après protection par l'extrait butanolique d'Artichaut

9 lots de 10 animaux reçoivent, 20 minutes avant les injections croissantes d'alcool, 10 mg/kg de l'extrait d'Artichaut préalablement débarrassé du butanol puis salifié. Les résultats, consignés dans le tableau suivant, permettent de fixer la DL 50 de l'alcool éthylique à 6,8 g/kg d'animal.

DL 50 APRES PROTECTION PAR L'EXTRAIT D'ARTICHAUT

Doses en g d'alcool par kg	5,2	5,6	6	6,4	6,8	7,2	7,6	8	8,4
Nombre de vivants	10	9	7	6	5	2	2	1	0
Nombre de morts	0	1	3	4	5	8	8	9	10
Vivants cumulés	42	32	23	16	10	5	3	1	0
Morts cumulés	0	1	4	8	13	21	29	38	48

3) - Discussion

Cette série d'observations permet de constater une augmentation assez importante des DL 50 et DL 100, après protection par le CHOPHYTOL, l'extrait butanolique d'Artichaut et le mélange quaternaire d'acides.

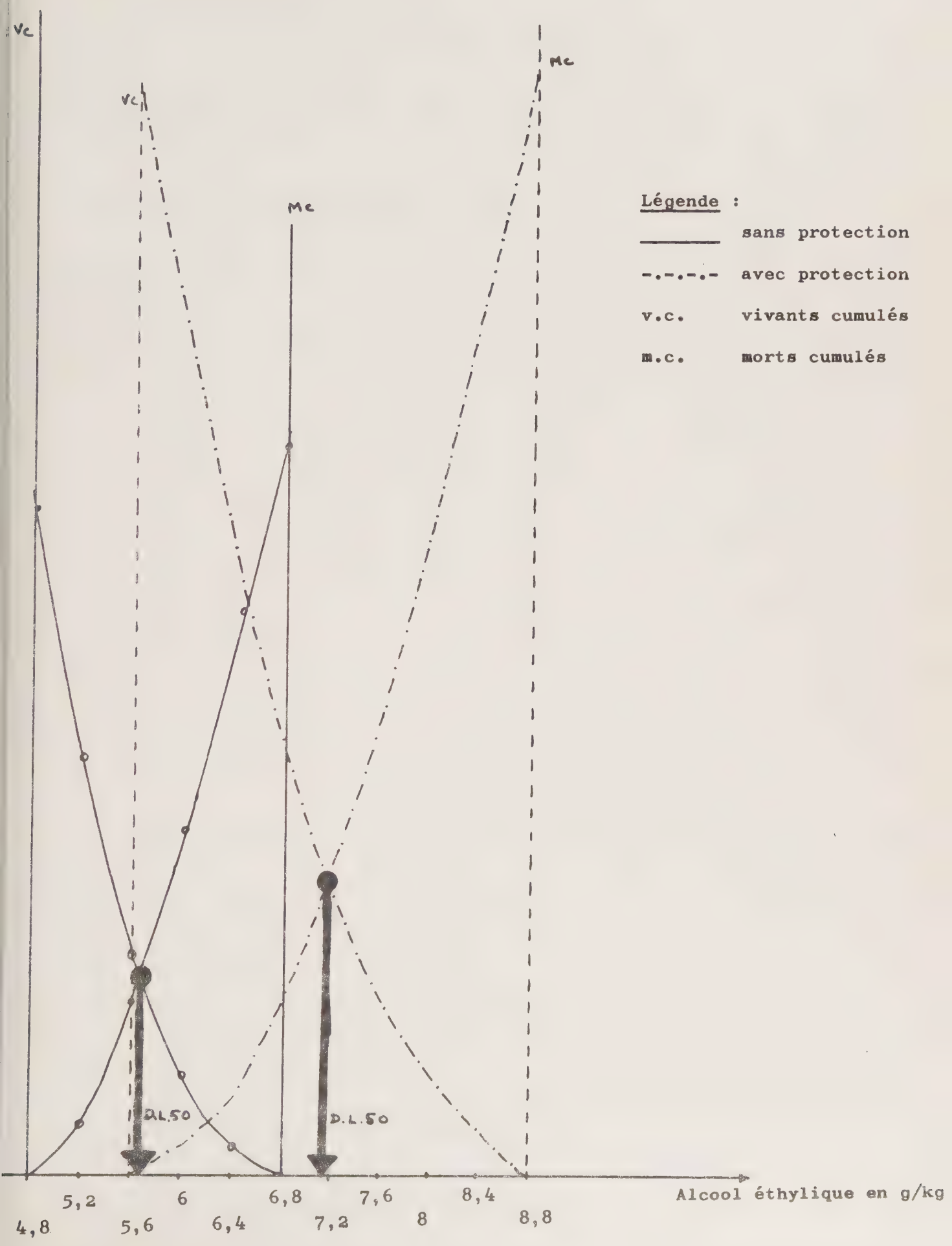
Les augmentations, après protection par le CHOPHYTOL et le mélange quaternaire, sont respectivement de 30 % pour la DL 50 et de 29 % pour la DL 100. On s'aperçoit que

l'augmentation est semblable dans ces deux cas, alors qu'elle est légèrement moins élevée (23 %), après protection par l'extrait d'Artichaut.

Nos expérimentations préliminaires nous ont montré, en outre, que la protection maximum est obtenue avec un mélange quaternaire contenant 2,5 mg/kg $\tilde{aa}$.

Lorsque les quantités injectées augmentent, l'effet protecteur diminue, observation qui confirme les effets constatés sur le PENTOBARBITAL, et que JONDET (1970) avait déjà mis en évidence pour le CHOPHYTOL. Il est probable que, dans les 10 mg d'extrait butanolique d'Artichaut, les proportions des quatre acides essentiels soient moins favorables, ce qui expliquerait un effet protecteur légèrement inférieur. On voit combien est importante la question des doses et proportions respectives des acides dans le mélange actif. Les effets détoxifiants optimum se manifestent pour des doses inscrites dans une étroite fourchette, en dehors de laquelle les effets s'atténuent.

Ce fait nous incline à penser qu'il s'agit, peut-être là encore, d'une activation enzymatique au niveau du foie ; ces extraits ou leurs constituants accélérant le métabolisme de l'alcool éthylique, fait qui serait à rapprocher de l'augmentation de coenzymes NADP et NADPH₂, mise en évidence dans le foie de rat après traitement par le CHOPHYTOL.



C H A P I T R E I V

MISE EN EVIDENCE DES EFFETS AMPHOCHOLERETIQUES

A - DEFINITION ET MODE D'ETUDE

Afin de vérifier expérimentalement l'action de l'extrait d'Artichaut ou de différents mélanges d'acides et d'acides-alcools sur le débit biliaire, nous avons toujours utilisé le rat. Avec cet animal en effet, il est possible d'opérer sur un grand nombre d'individus de même souche et de poids sensiblement identique ; de plus, le débit biliaire du rat est très stable, et ses modifications sous l'action d'agents chimiques facilement reproductibles. La faible amplitude des variations individuelles nous permet donc de calculer des moyennes représentatives des lots d'animaux mis en expérience.

Nous avons utilisé la méthode proposée par BOUCARD et LAUBENHEIMER (1966) afin de tenter de vérifier les deux critères de l'amphocholérèse énoncés par ces auteurs :

- . la substance amphocholérétique ne doit entraîner aucune variation sur le débit biliaire physiologiquement normal.
- . elle doit lutter contre toute variation de ce débit, soit en freinant un débit artificiellement élevé, soit en augmentant un débit diminué.

Le protocole expérimental préconisé par BOUCARD et LAUBENHEIMER (1966) est le suivant : on utilise des rats mâles Wistar, d'un poids de 200-250 g, provenant d'un même élevage. Ces animaux, à jeun depuis 18 heures, sont anesthésiés par de l'uréthane, administrée par voie intrapéritonéale, à raison de 1,4 g par kilo de poids d'animal (1,4 g/kg). Le rat est placé

en décubitus dorsal et, après laparotomie médiane, une fistule biliaire du canal cholédoque est réalisée. La bile est recueillie dans une pipette de 1 cm³ graduée au 1/100e ; les lectures sont faites toutes les 15 minutes à partir du moment où le débit biliaire est constant. Lorsque la cholérèse est stable, les animaux répartis en deux lots reçoivent les uns une solution isotonique de chlorure de sodium, et les autres la préparation à étudier administrée par voie intraveineuse dans la veine du pénis. Ces deux solutions ne doivent entraîner aucune variation du débit biliaire, afin de satisfaire le premier critère défini par BOUCARD.

La substance amphocholérétique sera ensuite testée par référence à deux lots d'animaux, les premiers ayant reçu par injection intraveineuse, une solution de déhydrocholate de sodium (D.H.C.) et les seconds une solution d'azide de sodium administrée dans les mêmes conditions. Les perturbations de la cholérèse ainsi induites seront comparées aux résultats obtenus avec deux autres lots d'animaux ayant reçu simultanément la substance à étudier et une solution de D.H.C. ou d'azide de sodium, ce qui permet de définir le deuxième critère de l'amphocholérèse, à savoir la diminution des variations de débit induites par ces substances.

B - ACTION AMPHOCHOLERETIQUE D'UN EXTRAIT D'ARTICHAUT

L'activité de l'extrait butanolique d'Artichaut a été appréciée suivant la méthode décrite précédemment. On examine tout d'abord ses effets sur l'hypercholérèse provoquée, puis sur l'hypochoolérèse provoquée.

I - ACTION SUR LA CHOLERESE

On utilise pour vérifier la stabilité de la cholérèse, deux lots d'animaux :

. Premier lot :

On injecte par voie intraveineuse 0,5 cm³ d'un soluté isotonique de chlorure de sodium pour 200 g de rat. Dans ces conditions, la cholérèse de base n'est pas modifiée, la moyenne du débit observé sur 15 animaux étant en 15 minutes de 0,13[±] 0,01 cm³ avant et après injection de chlorure de sodium.

Ces résultats expriment la remarquable stabilité du flux biliaire et correspondent à une moyenne physiologique.

. Deuxième lot :

Le deuxième lot témoin reçoit l'extrait butanolique d'Artichaut, débarrassé de toutes traces de solvant par distillation sous pression réduite, puis salifié à l'aide de bicarbonate de sodium. La dose administrée est de 80 mg/kg. Aucune variation du débit de base n'étant observée, le premier critère défini par BOUCARD "la substance amphotocholérétique n'entraîne aucune variation du débit biliaire physiologiquement normal" se trouve vérifié.

II - ACTION SUR L'HYPERCHOLERESE PROVOQUEE

1) - Protocole opératoire

A un lot d'animaux, on injecte par voie intraveineuse une solution de D.H.C. à raison de 10 mg/kg. Dans ces conditions, le débit de base est modifié et on observe une nette augmentation de la cholérèse. Ce débit est maximum pendant les

15 premières minutes et diminue ensuite pour atteindre le débit de base initial 45 minutes après l'injection.

Nous avons, au cours de toutes nos expériences, utilisé une dose de 10 mg/kg de D.H.C.. Cette dose a paru suffisante pour provoquer une augmentation franche de la cholérèse, vis-à-vis de laquelle l'effet amphocholérétique des solutions étudiées était aisément observable. Pour des doses supérieures, l'intensité de la réponse hypercholérétique était telle que l'extrait d'Artichaut ne manifestait plus son effet régulateur. Les cholérèses moyennes, après injection de 10 mg/kg de D.H.C. étaient de $0,186 \pm 0,005$ cm³ pendant les 15 premières minutes, période durant laquelle l'hypercholérèse est à son maximum, et que nous avons donc utilisé comme période de référence.

A ce même lot d'animaux, après retour de la cholérèse à la normale, on administre simultanément 10 mg/kg de D.H.C. et de l'extrait butanolique salifié d'Artichaut aux mêmes doses que lors des essais précédents, soit 80 mg/kg. Il apparaît alors une nette diminution de l'hypercholérèse par rapport à celle constatée lors de l'injection de D.H.C. seul : les moyennes des débits biliaires pendant les 15 premières minutes sont de $0,160 \pm 0,004$ cm³.

2) - Discussion des résultats

Ces expériences montrent que le débit de base reste inchangé pour les lots d'animaux 1 et 2, vérifiant ainsi le premier des deux critères définis par BOUCARD : l'extrait butanolique d'artichaut ne modifie pas la cholérèse. L'injection de D.H.C. à raison de 10 mg/kg par voie intraveineuse provoque une augmentation de la cholérèse d'environ 50 % pendant le

premier quart-d'heure ; cette augmentation n'est plus que de 25 % lors de l'injection simultanée de D.H.C. et d'extrait d'Artichaut. Ces résultats nous permettent de soupçonner une action amphocholérétique des préparations d'Artichaut, puisque ces dernières freinent l'augmentation du débit biliaire due au D.H.C..

3) - Valeur statistique des résultats

Il convenait néanmoins d'effectuer l'étude statistique de ces résultats afin d'en préciser le degré de signification et donc la valeur. Nous donnons à titre d'exemple dans le tableau T 14 les valeurs de la chlérèse observée sur un échantillon de 15 animaux. La valeur moyenne permet d'établir, par le calcul, la variance, l'écart type et enfin le quotient du test.

TAB. (T14)

VALEUR STATISTIQUE DU TEST D'HYPERCHOLERESE PROVOQUEE

DEBIT BILIAIRE APRES INJECTION DE 10 mg/kg de D.H.C.	:	DEBIT BILIAIRE APRES INJECTION SIMULTANEE DE 10 mg/kg DE D.H.C. ET DE 80 mg/kg D'EXTRAIT D'ARTICHAUT	:
0,17	:	0,15	:
0,18	:	0,16	:
0,19	:	0,16	:
0,19	:	0,16	:
0,19	:	0,17	:
0,20	:	0,17	:
0,18	:	0,16	:
0,19	:	0,17	:
0,19	:	0,16	:
0,19	:	0,16	:
0,18	:	0,15	:
0,20	:	0,16	:
0,18	:	0,16	:
0,18	:	0,15	:
0,19	:	0,16	:
Moyenne = M = 0,186	:	Moyenne = M = 0,160	:
Variance = 0,000066	:	Variance = 0,000042	:
Ecart type = 0,0081	:	Ecart type = 0,0065	:
Quotient de test = 16,73	:		:

III - ACTION SUR L'HYPOLÉTERÈSE PROVOQUÉE

Afin de vérifier l'action amphocholérétique de l'extrait butanolique d'Artichaut, il était indispensable de provoquer aussi une hypocholérèse et de constater son action vis-à-vis de la diminution du flux biliaire. L'hypocholérèse a été réalisée grâce à un inhibiteur enzymatique : l'azide de sodium, que VANLERENBERGUE et ses coll. (1963) considèrent comme inhibiteur de la cytochrome oxydase et des catalases. Ce composé entraîne une diminution du volume biliaire sans modifier la constitution de la bile.

1) - Protocole expérimental

L'expérimentation a été conduite comme précédemment. On utilise des rats Wistar mâles d'un poids moyen de 200 g, provenant d'un même élevage. Ces animaux à jeun depuis 18 heures sont anesthésiés à l'uréthane, à raison de 1,4 g/kg administré par voie intrapéritonéale. Après réalisation d'une fistule biliaire, la bile est recueillie dans une pipette de 1 cm³ graduée au 1/100e, les lectures étant faites toutes les 15 minutes.

Comme précédemment, on vérifie par comparaison à un soluté isotonique de chlorure de sodium, que l'extrait d'Artichaut seul ne modifie pas la cholérèse.

On utilise ensuite deux lots d'animaux auxquels on injecte respectivement l'azide de sodium seul et l'extrait d'Artichaut 10 minutes avant l'azide de sodium.

. Premier lot d'animaux :

On injecte à ce premier lot d'animaux, 1 mg/kg d'azide de sodium par voie intraveineuse. Le flux biliaire diminue

dès le premier quart d'heure ; cette hypocholérèse se poursuit pendant la première heure, se stabilise puis revient à la normale au bout de trois heures. Le pourcentage de variation du débit biliaire, après administration d'azide de sodium se traduit par une diminution de 27 %.

. Deuxième lot d'animaux :

Les animaux ont reçu comme précédemment une solution d'azide de sodium (1 mg/kg) par voie intraveineuse, dix minutes après l'injection d'extrait d'Artichaut à raison de 80 mg/kg. Dans ces conditions, la chute du débit biliaire est moins importante ; il ne diminue que de 9 % après 30 minutes. Cette action antagoniste est surtout manifeste au cours de la première heure, le flux biliaire se stabilisant au bout de trente minutes pour revenir à sa valeur normale 60 minutes après l'injection.

2) - Résultats et discussion

Ces résultats sont consignés dans le tableau T 15.

L'action amphocholérétique de l'extrait de Cynara scolymus obtenu suivant la méthode d'extraction décrite précédemment est donc indiscutable. Il restait à préciser les constituants responsables de cette action physiologique. Aussi avons-nous entrepris de vérifier l'éventuelle action amphocholérétique des acides et acides-alcools aliphatiques présents dans l'extrait.

C - ACTION AMPHOCHOLERETIQUE DES ACIDES ORGANIQUES PRESENTS DANS L'EXTRAIT D'ARTICHAUT

Les expériences ont été effectuées avec les acides succinique, malique, citrique, glycolique et glycérique des

TAB.(T14)

TEST D'HYPOCHOLERESE PROVOQUEE : POURCENTAGE DE VARIATION DU FLUX BILIAIRE (EN %)

	: 30 MINUTES APRES	: 60 MINUTES APRES	: 120 MINUTES APRES
	: L'INJECTION	: L'INJECTION	: L'INJECTION
Lot témoin	:	:	:
sol. physiologique	: + 2	: 0	: 0
Lot témoin	:	:	:
ext. d'Artichaut	: - 1	: 0	: 0
Lot n° 1	:	:	:
azide de sodium	: - 27	: - 18	: - 9
Lot n° 2	:	:	:
azide de sodium	: - 9	: 0	: + 10
+	:	:	:
ext. d'Artichaut	:	:	:

laboratoires Merck. L'acide ~~α~~hydroxyméthylacrylique employé avait été préparé par synthèse. Ces acides ont été utilisés seuls ou en mélange, afin de définir leur activité hépatique.

I - ACTION SUR LA CHOLERESE

Après réalisation d'une fistule biliaire, on injecte des doses croissantes de chacun de ces acides, préalablement salifiés, dans les mêmes conditions que précédemment. Quel que soit l'acide utilisé, aucune hypercholérèse ne se manifeste.

Dans une deuxième série d'expériences, on vérifie si ces mêmes acides, administrés cette fois en mélange, augmentent la cholérèse de base. Nous avons testé un certain nombre de mélanges binaires et ternaires. Les résultats sont à nouveau négatifs : les associations d'acides par groupe de deux, trois, quatre, cinq ou six ne modifient en rien le débit biliaire, pas plus d'ailleurs que ne le faisait l'extrait butanolique d'Artichaut.

Nous nous sommes alors attachés à rechercher l'action amphocholérétique éventuelle de ces acides, administrés isolément ou en association.

II - ACTION SUR L'HYPERCHOLERESE PROVOQUEE

1) - Protocole opératoire

La méthode utilisée est identique à la précédente. L'hypercholérèse est obtenue grâce au D.H.C. administré à raison de 10 mg/kg. Les acides témoins sont successivement testés aux doses suivantes :

- acide seul : 40 mg/kg
- mélange de 2 acides : 20 mg/kg $\tilde{a}\tilde{a}$
- mélange de 3 acides : 13 mg/kg $\tilde{a}\tilde{a}$
- mélange de 4 acides : 10 mg/kg $\tilde{a}\tilde{a}$
- mélange de 5 acides : 8 mg/kg $\tilde{a}\tilde{a}$
- mélange de 6 acides : 6,5 mg/kg $\tilde{a}\tilde{a}$

Dans ces conditions, la quantité totale administrée est toujours de 40 mg/kg, quel que soit le nombre des composants de l'association.

Le même animal reçoit en I.V. le D.H.C. à la dose de 10 mg/kg. Puis, après retour à la cholérèse de base, une nouvelle injection simultanée de D.H.C. et du mélange d'acides est pratiquée. Dans ces conditions, il nous était possible d'exprimer en pourcentage, par rapport à l'effet du D.H.C. seul, l'augmentation de la cholérèse produite par le mélange des acides et du D.H.C. : un effet amphocholérétique doit réduire cette augmentation.

2) - Discussion des résultats

Les résultats obtenus figurent au tableau T 16.

L'examen de ce tableau montre qu'aucune diminution de l'hypercholérèse, lors de l'injection simultanée d'un acide et du D.H.C. n'a pu être observée, même lorsque la dose d'acide est doublée (80 mg/kg).

L'association de deux acides dont nous avons testé plusieurs couples aux doses de 20 mg/kg $\tilde{a}\tilde{a}$ n'agit pas davantage. On note toutefois que seul le mélange binaire, constitué par de l'acide malique et de l'acide succinique à la dose de 200 mg/kg $\tilde{a}\tilde{a}$ ralentit de 10 % environ l'augmentation du débit biliaire.

Pour des doses de 40 mg/kg, l'action amphocholérétique

TAB.(T16)

TEST D'HYPERCHOLERESE PROVOQUEE : POURCENTAGE D'AUGMENTATION DE LA CHOLERESE

. Acide seul 40 mg/kg	100 %
Acide seul 80 mg/kg	100 %
. Association de 2 acides (20 mg/kg aa)	100 %
(malique + succinique)	
(malique + H.M.A.)	
Association malique succinique 200 mg/kg aa	90 %
. Association de 3 acides (13 mg/kg aa)	
(malique + succinique + citrique)	85 %
. Association de 4 acides (10 mg/kg aa)	
(malique + succinique + citrique + H.M.A.)	30 %
. Association de 5 acides (8 mg/kg aa)	
(malique + citrique + succinique + glycolique + H.M.A.)	30 %
. Association des 6 acides (6,5 mg/kg aa)	30 %

ne se manifeste qu'à partir des associations ternaires, le mélange des acides malique, succinique et citrique à la dose de 13 mg/kg $\tilde{\alpha}$ s'étant révélé le plus actif.

Cette activité hépatique atteint son effet maximum avec l'association quaternaire constituée par les acides malique, succinique, citrique et H.M.A. (10 mg/kg $\tilde{\alpha}$) réprime aussi fortement l'hypercholérèse que le mélange constitué par l'ensemble des acides glycolique, glycérique, citrique, succinique, malique et H.M.A. (10 mg/kg $\tilde{\alpha}$). Les acides glycolique et glycérique ne semblent donc pas potentialiser le mélange des acides malique, citrique, succinique et H.M.A.. Ils ne produisaient d'ailleurs aucun effet dans les mélanges binaires ou ternaires.

Cette association de 4 acides est donc la plus efficace sur l'hypercholérèse : elle reflète d'ailleurs bien la répartition de ces corps organiques dans l'extrait d'Artichaut, et rend compte ainsi des effets amphotocholérétiques de cet extrait. En effet, on a constaté précédemment que les acides glycérique et glycolique ne se trouvent qu'en assez faibles quantités dans l'extrait butanolique d'Artichaut, obtenu après hydrolyse acide ou sans hydrolyse. Ils sont même pratiquement absents dans l'extrait obtenu après hydrolyse alcaline.

3) - Valeur statistique des résultats

A titre d'exemple, nous donnons dans le tableau T 17 les résultats obtenus sur un lot d'animaux traités par l'association des 4 acides suivants : acides malique, succinique, citrique et H.M.A. (10 mg/kg $\tilde{\alpha}$)

TAB. (T17)

VALEUR STATISTIQUE DU TEST D'HYPERCHELERESE PROVOQUEE

DEBIT BILIAIRE APRES INJECTION :		DEBIT BILIAIRE APRES INJECTION SIMULTANEE :	
DE 10 mg/kg DE D.H.C.		DE 10 mg/kg DE D.H.C.	
		ET DE L'ASSOCIATION DES 4 ACIDES	
	0,19		0,17
	0,18		0,15
	0,19		0,16
	0,19		0,16
	0,17		0,15
	0,20		0,15
	0,19		0,16
	0,19		0,16
	0,19		0,15
	0,18		0,16
	0,19		0,16
	0,19		0,17
	0,20		0,17
	0,18		0,15
Moyenne = M =	0,188	Moyenne = M =	0,159
Variance =	0,000064	Variance =	0,000059
Ecart type =	0,0080	Ecart type =	0,0077
Quotient de test =	13,2		

III - ACTION SUR L'HYPOCHOLERESE PROVOQUEE

1) - Protocole opératoire

L'action des associations d'acides devait être également vérifiée vis-à-vis de la diminution du flux biliaire. L'hypocholérèse a été réalisée comme précédemment à l'aide d'une solution d'azide de sodium administrée à raison de 1 mg/kg par voie intraveineuse.

L'expérimentation a porté sur deux lots d'animaux. Un premier lot témoin, reçoit l'azide de sodium seul ; un deuxième lot reçoit la même dose d'azide de sodium, dix minutes après l'injection du mélange salifié d'acides. Ces deux lots d'animaux sont comparés à deux autres lots ayant reçu l'un une solution de chlorure de sodium isotonique et l'autre la solution salifiée du mélange d'acides étudiés.

Comme précédemment, nous avons vérifié l'activité des acides seuls, puis en mélange binaire et ternaire vis-à-vis de l'hypercholérèse. Aucune activité amphocholérétique ne s'étant manifestée, nous avons donc limité notre investigation à l'étude du mélange quaternaire suivant : acide malique, succinique, citrique, et H.M.A. aux doses de 10 mg/kg.

2) - Discussion des résultats

Les résultats obtenus figurent au tableau T 18.

Comme précédemment, l'action antagoniste des acides en association, vis-à-vis de l'hypocholérèse, est surtout manifeste au cours de la première heure. Le pourcentage de diminution du débit biliaire qui est de 27 % après l'injection d'azide de sodium, tombe à 8 % seulement lorsque cet azide est administré avec l'association des 4 acides. Dans ce cas, la

TAB. (T18)

TEST D'HYPOCHOLERESE PROVOQUEE : POURCENTAGE DE VARIATION DU FLUX BILIAIRE (EN %)

	: 30 MINUTES APRES	: 60 MINUTES APRES	: 120 MINUTES APRES	:
	: L'INJECTION	: L'INJECTION	: L'INJECTION	:
Lot témoin	:	:	:	:
sol. physio.	:	:	:	:
de chlorure de sodium	:	:	:	:
	:	:	:	:
Lot témoin	:	:	:	:
mél. d'acides	:	:	:	:
	:	:	:	:
Lot n° 1	:	:	:	:
azide de sodium	:	:	:	:
	:	:	:	:
Lot n° 2	:	:	:	:
azide de sodium	:	:	:	:
+	:	:	:	:
mél. des 4 acides	:	:	:	:
	:	:	:	:

chute du débit biliaire se stabilise au bout de trente minutes, pour retrouver sa valeur normale environ soixante minutes après l'injection. En revanche, après 2 heures, la cholérèse des animaux traités par l'azide de sodium seul n'a toujours pas atteint sa valeur normale.

On constate donc, à l'issue de cette série d'expérimentations, que le mélange quaternaire des acides malique, succinique, citrique et H.M.A. est bien l'agent responsable des effets amphocholérétiques mis en évidence sur l'extrait butanolique d'Artichaut.

D - VARIATIONS DES DIVERS CONSTITUANTS BILIAIRES

Lors de la mise en évidence des activités amphocholérétiques des extraits butanoliques d'Artichaut et du mélange quaternaire d'acides ; nous avons recueilli la bile afin de doser la bilirubine conjuguée et de déterminer les taux respectifs de cholestérol libre, estérifié et total.

Ces dosages permettent d'apprécier les variations que pouvaient subir les constituants biliaires lors des diverses injections.

Les taux de bilirubine conjuguée, de cholestérol libre et estérifié sont déterminés par une microméthode, sur des prises d'essai variant de 0,25 à 0,40 cm³.

Les résultats obtenus, ainsi que les débits biliaires sont exprimés en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport aux valeurs témoins obtenues après injection de sérum physiologique.

Les résultats, consignés dans le tableau T 19, diffèrent selon que l'on a une hypo ou une hypercholérèse ; nous

envisagerons donc ces divers cas afin de les commenter et de les comparer.

I - VALEURS OBTENUES APRES HYPERCHOLERESE PROVOQUEE

L'injection de DEHYDROCHOLATE de sodium (D.H.C.), à la dose de 10 mg/kg, augmente de 20 % le débit biliaire ; dans ce cas les divers constituants biliaires ne suivent pas toujours cet accroissement. En effet, la concentration de la bile en bilirubine est diminuée et, en revanche, on note une légère augmentation du cholestérol estérifié dans la bile ; la quantité totale de cholestérol estérifié émise augmente de 30 % alors que l'augmentation du volume biliaire n'est que de 20 % ; le D.H.C. semble donc diluer la bile et augmenter davantage le cholestérol estérifié. Des résultats identiques sont obtenus après injection simultanée de D.H.C. et du mélange ou de D.H.C. et de l'extrait d'Artichaut. Il faut noter que, dans ce cas, la variation du débit biliaire n'est plus que de 7 % ; les extraits ou le mélange quaternaire s'opposent à l'hypercholérèse, ce qui est en parfait accord avec le premier critère auquel doit répondre l'amphocholérèse. Dans ce cas la concentration de la bile en bilirubine est encore une fois légèrement diminuée, mais par contre on note une très nette augmentation du cholestérol estérifié passant à 59 % pour une valeur de 7 % d'augmentation du débit biliaire. Le taux de cholestérol libre ne varie pas et le cholestérol total suit donc l'augmentation due au cholestérol estérifié, ce qui se traduit par un rapport cholestérol estérifié sur cholestérol total $\frac{C-E}{C-T}$ égal à 0,55. Comme précédemment, nous avons donc une dilution de la bilirubine, mais par contre il faut noter une concentration encore plus élevée en cholestérol estérifié.

II - VALEURS OBTENUES APRES HYPOCHOLERESE PROVOQUEE

L'injection d'azide de sodium, à la dose de 1 mg/kg, diminue la cholérèse de 13 % pendant le premier quart d'heure. Cette diminution s'accompagne d'une chute nette de la concentration des divers constituants biliaires. On remarque notamment une baisse importante de bilirubine conjuguée (- 41 %) et du cholestérol libre et estérifié (- 47 % et - 54 %) par rapport à la chute de - 13 % du débit biliaire. On s'aperçoit que ce toxique, diminuant la cholérèse normale, entraîne également la chute brutale des divers constituants biliaires, fait qui est sans doute à rapprocher des activités inhibitrices de l'azide de sodium à l'égard des cytochromes oxydases et catalases.

Par contre, on constate que l'hypocholérèse induite par ce toxique est annulée si on a eu la précaution d'injecter, dix minutes avant ce toxique, le mélange quaternaire ou l'extrait d'Artichaut, vérifiant ainsi le deuxième critère de l'amphocholérèse. Dans ces conditions, on note une augmentation de la concentration de la bile en tous ces constituants. Cette augmentation, en valeur absolue, par rapport aux concentrations de la bile secrétée après injection d'azide de sodium seul, peut être considérable.

III - DISCUSSION

Si le mélange quaternaire d'acides ou de l'extrait d'Artichaut injectés seuls ne modifient en rien le volume de la cholérèse normale, on remarque également peu de changement des constituants biliaires, si ce n'est une légère augmentation du cholestérol estérifié et une diminution du cholestérol libre

TAB. (V19) : VARIATION EN % DES DIVERS CONSTITUANTS BILIAIRES

	Débit/h	Variation du débit en %	Bilirubine en γ/cm^3	Cholestérol Total :		Cholestérol libre :		Cholestérol estérifié :	$\frac{C E}{C T}$
				γ/cm^3	% en + ou -	mg/cm^3	% en + ou -	mg/cm^3	
émoins sérum phy.	0,32 cm^3/h	-	123 γ/cm^3	3,4 mg/cm^3		1,9 mg/cm^3		1,5 mg/cm^3	0,44
mélange quaternaire	-	0 %	0 %	0 %		- 11 %		+ 6 %	0,45
Extrait butanolique	-	0 %	- 1 %	0 %		- 11 %		+ 6 %	0,48
Azide	-	- 13 %	- 41 %	- 50 %		- 47 %		- 54 %	0,40
Azide + mélange	-	0 %	+ 13 %	- 6 %		- 15 %		+ 3 %	0,48
Azide + extrait	-	0 %	+ 10 %	- 10 %		- 15 %		- 3 %	0,47
D.H.C.	-	+ 20 %	+ 7 %	+ 26 %		+ 14 %		+ 30 %	0,46
D.H.C. + mélange	-	+ 7 %	- 8 %	+ 28 %		+ 6,5 %		+ 59 %	0,55
D.H.C. + extrait	-	+ 6,5 %	- 6 %	+ 25 %		+ 7 %		+ 59 %	0,55

Par contre, cette association d'acides ou l'extrait d'Artichaut, lorsqu'ils sont injectés simultanément avec le D.H.C., si elle diminue le volume de bile émis lors d'une injection de D.H.C., seul, semblent augmenter considérablement le taux de cholestérol estérifié dans la bile. Cette augmentation résulte peut-être d'une potentialisation du D.H.C. par ces produits à l'égard de ce constituant biliaire.

D'autre part, vis-à-vis de l'hypocholérèse induite par l'azide de sodium, l'effet est l'inverse. Nous assistons à une action antagoniste des produits injectés à l'égard de ce poison. Dans ces conditions, les effets toxiques de l'azide de sodium semblent inexistantes, il n'y a plus de chute des divers constituants biliaires. On vérifie ainsi une fois de plus le rôle détoxiquant du mélange quaternaire d'acides et de l'extrait d'Artichaut.

Ces expériences attirent notre attention sur la valeur toute relative de la notion d'amphocholérèse telle qu'elle a été définie par ses auteurs (BOUCARD, 1966). En effet, les critères qui permettent de cerner ce phénomène ne sont pas comparables. L'un fait appel à une molécule physiologique atoxique le D.H.C., dont il réduit sensiblement l'activité hypercholérétique sans modifier de manière importante la composition de la bile. Par contre le second met en oeuvre une molécule très toxique, l'azide de sodium, qui provoque des inhibitions métaboliques qui semblent se manifester d'une part sur le volume de bile émise qui diminue, d'autre part sur sa constitution, dont on constate une chute importante de ces constituants. C'est donc par un effet proprement détoxiquant que les mélanges d'acides et les extraits d'Artichaut agissent sur l'azide de sodium.

C H A P I T R E V

EFFETS DIURETIQUES

A - PRINCIPES DIURETIQUES DE L'ARTICHAUT

L'Artichaut, utilisé depuis longtemps en médecine populaire pour ces propriétés hépatiques, figure également sur la longue liste des plantes employées empiriquement comme diurétique.

Cette activité diurétique est imputée notamment à la présence, dans cette Tubuliflore, de dérivés flavoniques, de cynarine (0,50 % pour 100 g de plantes sèches) et de sels minéraux en fortes proportions (12 % de potassium et magnésium) (PARIS et coll., 1971). On pouvait dès lors se demander si les extraits butanoliques d'Artichaut, débarrassés de toutes substances polyphénoliques, flavoniques et minérales, conservaient encore une action diurétique ? Et dans l'affirmative, si cette activité était susceptible d'être attribuée aux acides et acides-alcools présents dans ces préparations. Nous avons donc recherché l'éventuelle activité diurétique de nos extraits et des diverses associations d'acides témoins étudiées précédemment.

L'activité diurétique a été étudiée sur le rat et le lapin.

L'étude de la diurèse chez le rat a permis de mettre en évidence très rapidement l'activité pharmacologique des divers extraits et des associations d'acides témoins, les essais sur le lapin venant ensuite confirmer avec plus de précisions ces résultats.

B - ETUDE DE LA DIURESE SUR LE RAT

Nous avons utilisé des rats mâles de souche Wistar provenant d'un même élevage et d'un poids moyen de 250 g. Après anesthésie, par administration d'uréthane à raison de 1,4 g/kg et par voie intrapéritonéale, le rat, placé en decubitus dorsal, est perfusé à l'aide d'une solution isotonique de chlorure de sodium destinée à assurer la surcharge hydrique, à raison de 0,2 cm³ par minute pour 200 g de rat. L'urine est recueillie, après cathétérisation des uretères, dans une pipette graduée au 1/100e.

L'activité diurétique est évaluée en mesurant le temps mis par le rat pour uriner un volume de 0,02 cm³ (débit moyen pendant 5 minutes). Ce temps est diminué lorsqu'on administre des extraits d'Artichaut ou des associations d'acide comme l'illustrent les résultats figurant au tableau T 20.

A la lecture de ce tableau, on constate que les extraits d'Artichaut, débarrassés de toutes traces de butanol par évaporation sous pression réduite, salifiés et fixés à pH 7 par addition de bicarbonate de sodium, présentent une action diurétique. Cette activité est comparable à celle induite par l'association des acides malique, citrique, succinique et hydroxyméthylacrylique, administrés aux mêmes doses que pour la détermination des effets amphocholérétiques. Ce mélange se révèle être le plus actif. Nous avons pu vérifier par la même méthode que les acides testés séparément ou en association binaire, ne provoquent aucune augmentation de la diurèse, pas plus d'ailleurs qu'ils ne possédaient isolément une activité amphocholérétique, ces effets ne commençant à se manifester qu'avec les mélanges ternaires.

TAB.(T20) : DIURESE EXPERIMENTALE CHEZ LE RAT

SUBSTANCES INJECTEES	TEMPS D'ELIMINATION DE 0,02 CM ³ D'URINE
<u>RAT N° 1</u>	4' 15"
Perfusion d'une sol. isotonique de chlorure de sodium (0,2 cm ³ /mn/200 g)	3' 30" 4' 6" 4' 25" 5'
<u>RAT N° 2</u>	6' 30" 6' 50" injection → 3' 25" 3' 4' 35" 5' 55" 6' 40"
Extrait butanolique d'artichaut après hydrolyse alcaline (40 mg/kg)	
<u>RAT N° 3</u>	7' 40" injection → 7' 10" 3' 40" 3' 20" 3' 50" 4' 30" 5' 40" 6' 50"
Extrait butanolique d'artichaut après hydrolyse acide (40 mg/kg)	
<u>RAT N° 4</u>	8' 50" 8' 20" injection → 5' 4' 15" 4' 10" 5' 6' 20" 7' 30"
Extrait butanolique d'artichaut sans hydrolyse (40 mg/kg)	
<u>RAT N° 5</u>	9' injection → 3' 50" 5' 10" 5' 30" 6' 10" 6' 50" 7' 30" 8' 10"
Association ternaire malique + citrique + succinique (13 mg/kg aa)	
<u>RAT N° 6</u>	6' 45" 6' 17" 6' 21" injection → 2' 30" 2' 40" 3' 10" 4' 4' 50" 5' 45" 7'
Association quaternaire citrique + malique + succinique + H.M.A. (10 mg/kg aa)	

Ces expériences montrent que le débit urinaire varie considérablement d'un animal à l'autre ; ces variations importantes ne permettent pas de comparer des lots d'animaux, car les résultats ont peu d'homogénéité. Cette étude du flux urinaire ne constitue donc qu'une approche grossière du problème ; aussi l'essai de diurèse a-t-il été réalisé sur le lapin. Il est possible alors de mesurer avec plus de précisions, le débit urinaire et de suivre en outre sur un même animal, après avoir pratiqué des injections différentes, le bilan ionique des urines émises ainsi que leur pH.

C - DIURESE EXPERIMENTALE SUR LE LAPIN

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le travail sur le lapin permet une étude plus fine des variations de la diurèse.

Le lapin, anesthésié par injection intrapéritonéale de carbamate d'éthyle à raison de 1,4 g/kg, placé en décubitus dorsal, est perfusé dans la veine jugulaire par une solution isotonique de chlorure de sodium destinée à assurer la surcharge hydrique, à raison de 1 cm³ par minute et par kilo d'animal.

Après laparotomie médiane et cathétérisation des uretères, l'urine est recueillie dans un godet collecteur de 1,5 cm³, solidaire d'un axe qui bascule automatiquement lorsque ce volume est atteint. Ces urines sont ainsi recueillies dans des tubes en verre neutre et serviront ultérieurement au contrôle du pH et aux dosages des ions sodium, potassium et chlorures.

II - MATERIEL UTILISE

Le schéma suivant illustre le montage utilisé (Fig. F 15)

Lorsque le volume de 1,5 cm³ a été atteint, le godet collecteur se vide et coupe automatiquement le contact d'un stylet inscripteur se déplaçant verticalement à raison d'1 mm par seconde. Ce stylet retombe alors sur sa ligne de base ; les mouvements du stylet s'inscrivent sur le tambour noirci d'un chymographe se déroulant à 4 mm par minute.

L'enregistrement est matérialisé par des triangles dont la base représente le temps mis par le lapin pour uriner 1,5 cm³.

III - RESULTATS

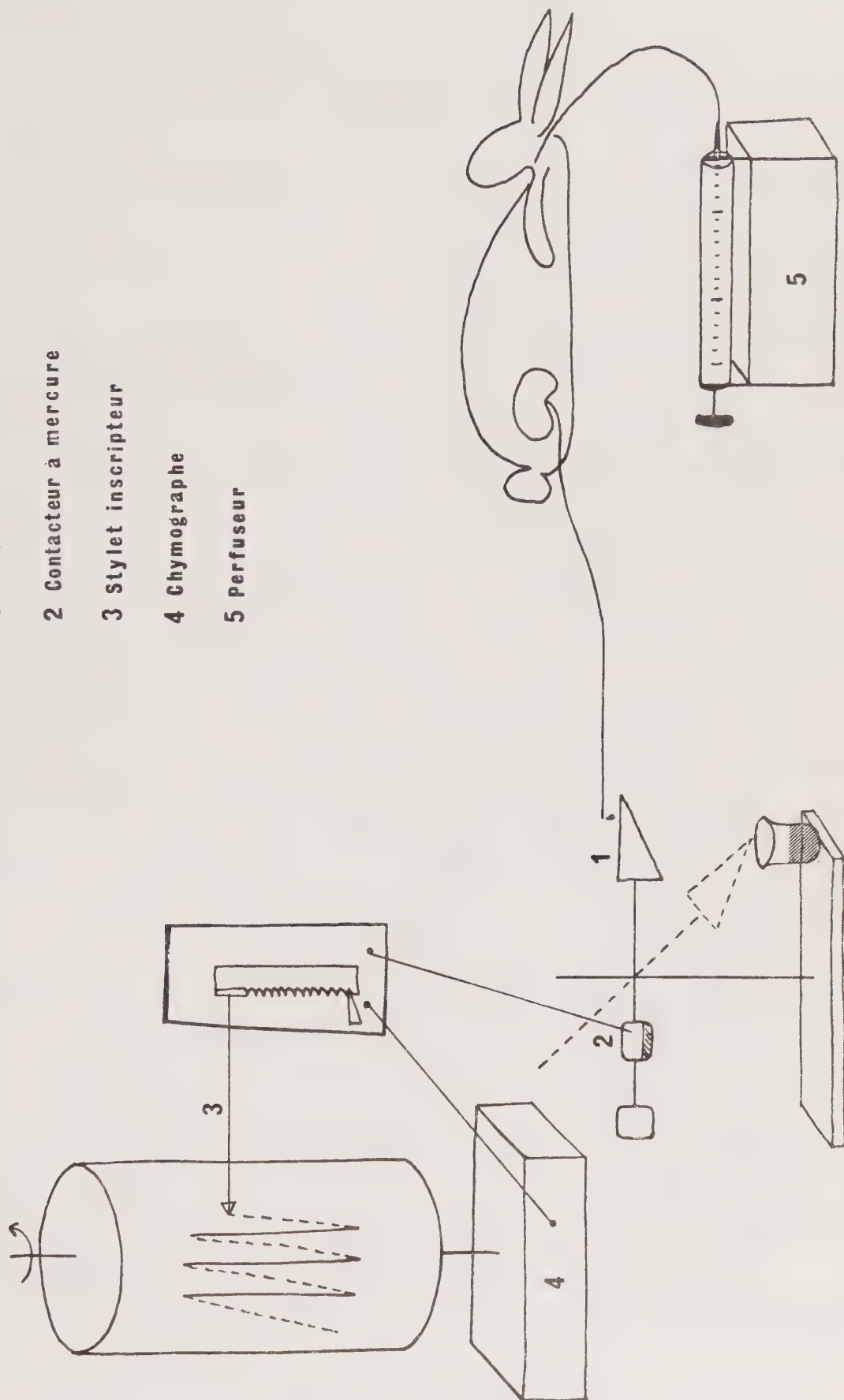
Au cours de nos expérimentations, nous avons vérifié l'action diurétique des divers acides d'abord séparément, puis en association. Les acides, injectés par voie intraveineuse dans la jugulaire du lapin, sont préalablement salifiés par une solution de bicarbonate de sodium à 10 % et le pH est fixé à 6,9 - 7,1.

Cependant, avant de pouvoir interpréter ces résultats, nous avons voulu vérifier l'effet de cette solution de bicarbonate de sodium injectée en I.V. sur le lapin afin de rechercher d'éventuels effets sur la diurèse.

En effet, bien que les acides et acides-alcools ainsi que les divers extraits végétaux salifiés ne contiennent plus de bicarbonate, il paraissait souhaitable de vérifier l'action d'une solution de bicarbonate dont la concentration est égale à celle utilisée pour salifier les acides, soit environ 40 mg/kg de poids d'animal.

FIG. (F15) : Schéma de l'appareillage

- 1 Godet collecteur
- 2 Contacteur à mercure
- 3 Stylet inscripteur
- 4 Chymographe
- 5 Perfuseur



1) - Action diurétique d'une solution de bicarbonate de sodium

Dans les conditions expérimentales décrites précédemment, on constate que le bicarbonate de sodium n'augmente pas la diurèse. La surface des triangles, visualisant l'effet diurétique du produit, ne diminue pas après son administration comme l'indique la figure F 16.

2) - Action diurétique des acides et acides-alcools utilisés seuls

Les acides et acides-alcools salifiés puis injectés par voie intraveineuse ne provoquent pas d'augmentation importante de la diurèse à la dose de 40 mg/kg. Cependant, il faut signaler que l'acide glycérique à cette dose provoque un accroissement du flux urinaire d'environ 50 % pendant 10 minutes. Ceci est d'ailleurs en accord avec les observations de BALAN-SARD (1952), qui avait décrit l'action diurétique de cet acide et précisé son activité à la dose de 50 mg/kg après administration des sels de cet acide par voie parentérale à des lapins.

De même, l'acide α hydroxyméthylacrylique à la dose de 40 mg/kg provoque également une diurèse dont l'augmentation est de 42 % et la durée de 8 minutes 45 secondes avant le retour à la diurèse normale.

La figure F 17 reproduit les enregistrements graphiques correspondant à l'action de ces deux composés.

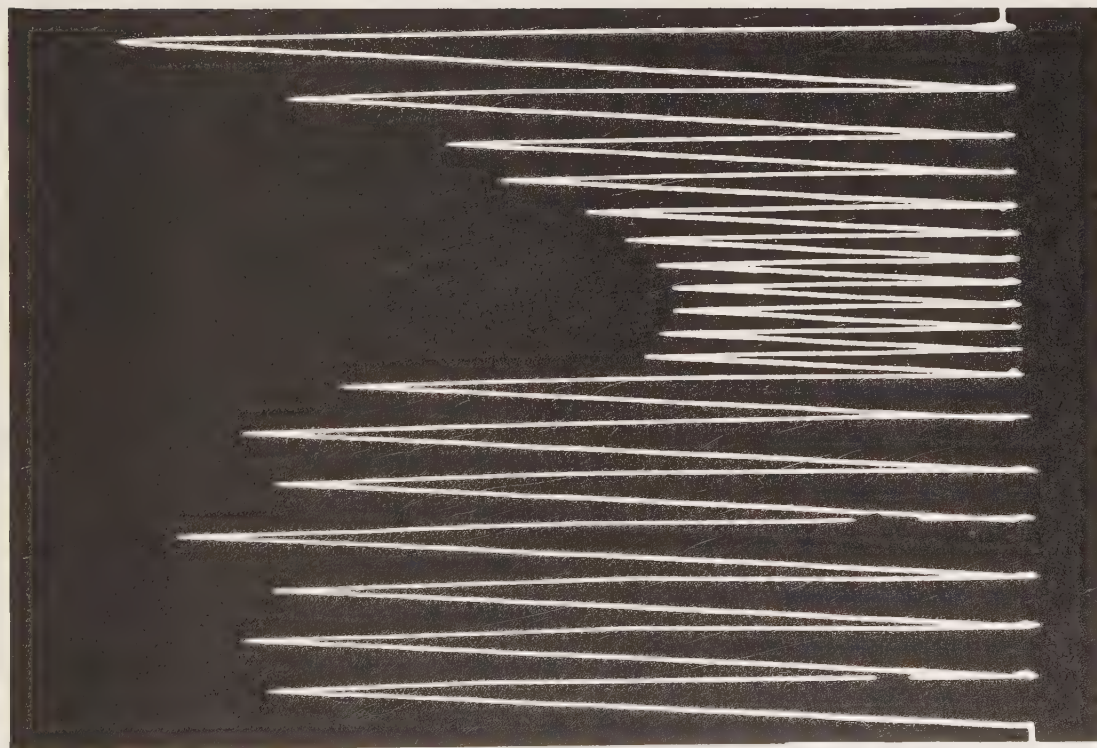
Aucune activité diurétique n'a pu être observée avec les autres acides utilisés séparément à la dose de 40 mg/kg.

FIG (F16) BICARBONATE DE SODIUM.

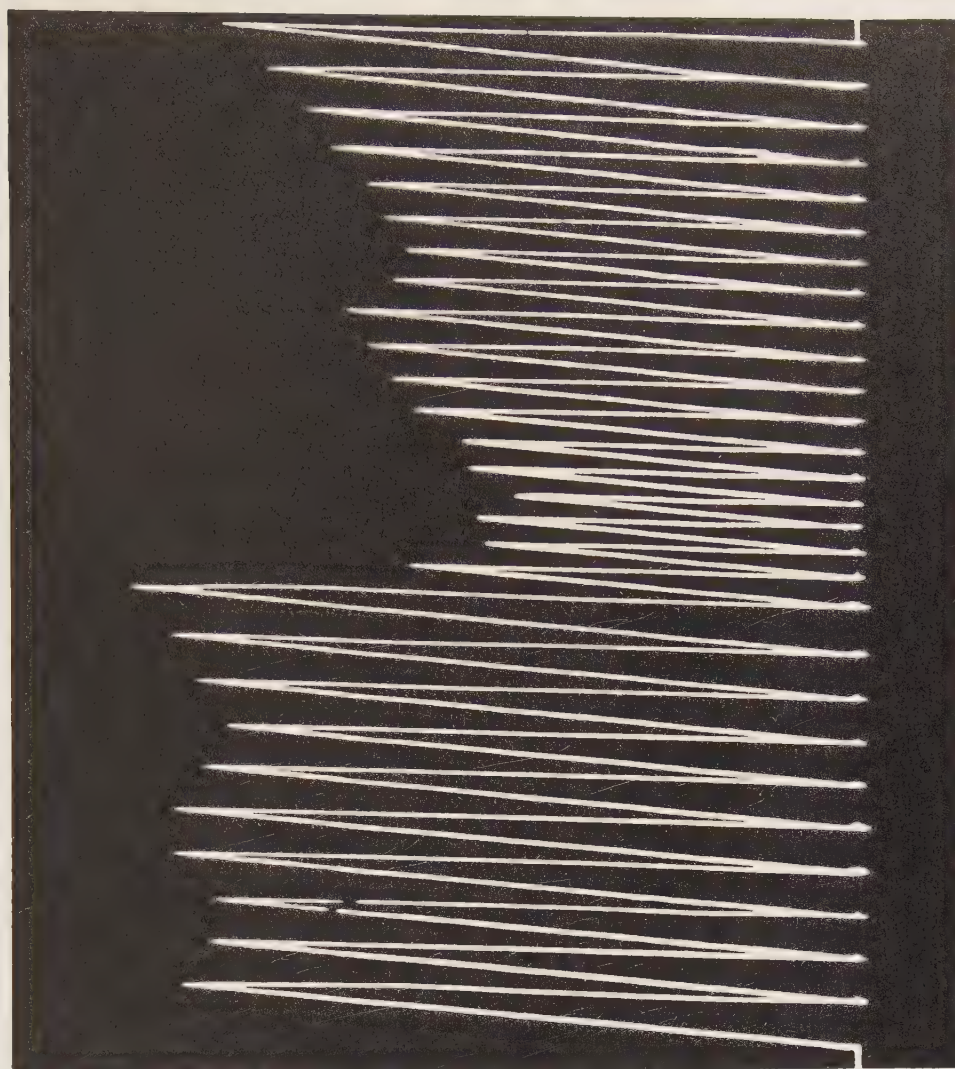


Solution de bicarbonate de sodium: 40mg/Kg.

FIG. (F17): ACIDES SEULS.



1) Acide glyccérique. 40mg/Kg



2) H.M.A. 40mg/Kg

3) - Action diurétique des mélanges d'acides

Nous avons testé puis comparé entre eux plusieurs mélanges d'acides en associations binaire, ternaire et quaternaire.

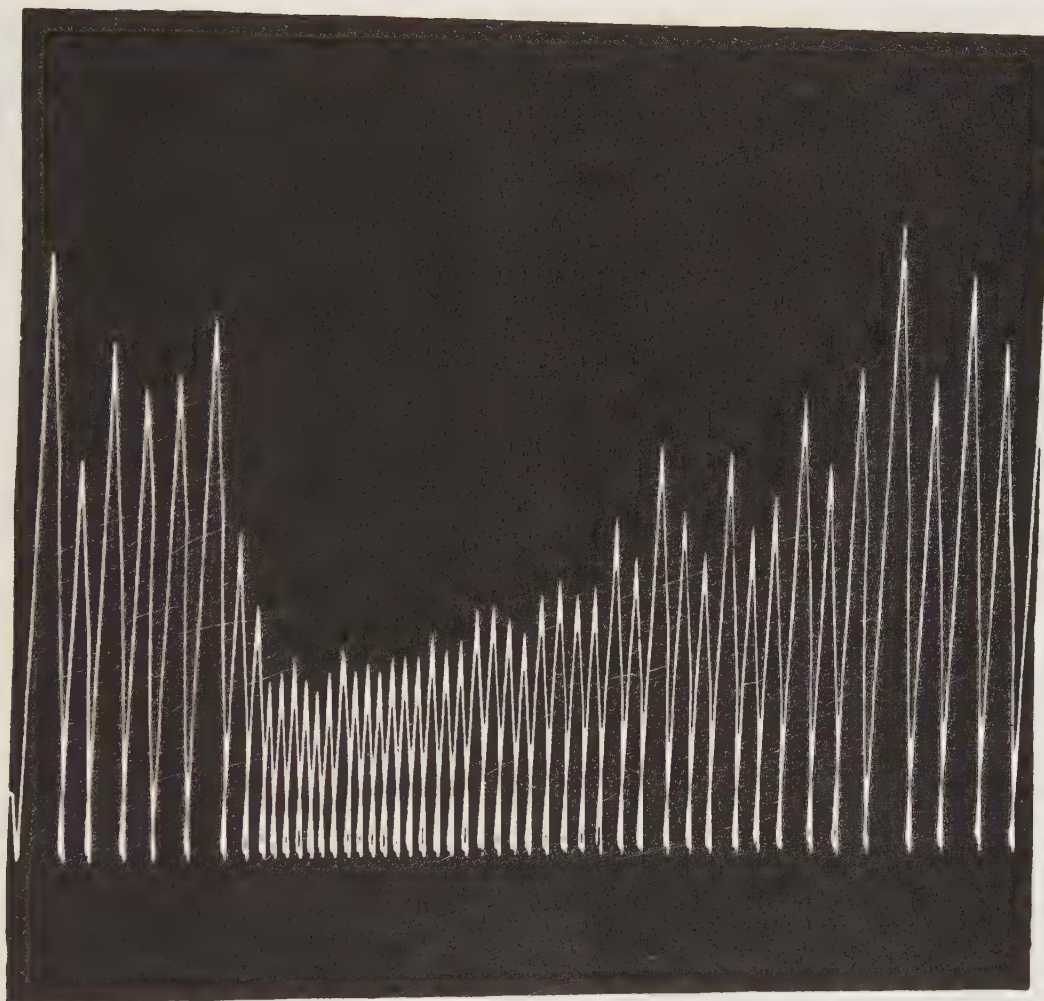
Ainsi, après injection aux doses respectives de 20 mg $\tilde{a}\tilde{a}$ /kg, 13,3 mg $\tilde{a}\tilde{a}$ /kg et 10 mg $\tilde{a}\tilde{a}$ /kg, on constate que seul le mélange binaire, composé par l'association des acides glycérique et glycolique, provoque une augmentation du flux urinaire de 88 % pour une durée d'action de 23 minutes 45 secondes nécessaire au retour à la normale de la diurèse (Fig. F 18).

Cette constatation est en accord avec les observations de BALANSARD (1952).

Le mélange ternaire, qui présente une activité diurétique certaine, est composé des acides malique, succinique et H.M.A.. Dans ces conditions, l'augmentation de la diurèse est de 135 % pour une durée d'action de 21 minutes. D'autres associations ternaires, telles que acide malique, citrique, H.M.A. ou citrique, malique et succinique, donnent respectivement les résultats suivants : augmentation de la diurèse : 56 % pour une durée de 10 minutes, et 53 % pour une durée efficace de 11 minutes 45 secondes. Il semble donc que seule l'association malique, succinique et H.M.A. présente une réelle activité diurétique comparée aux autres mélanges ternaires, comme le montrent les figures F 19 et F 20.

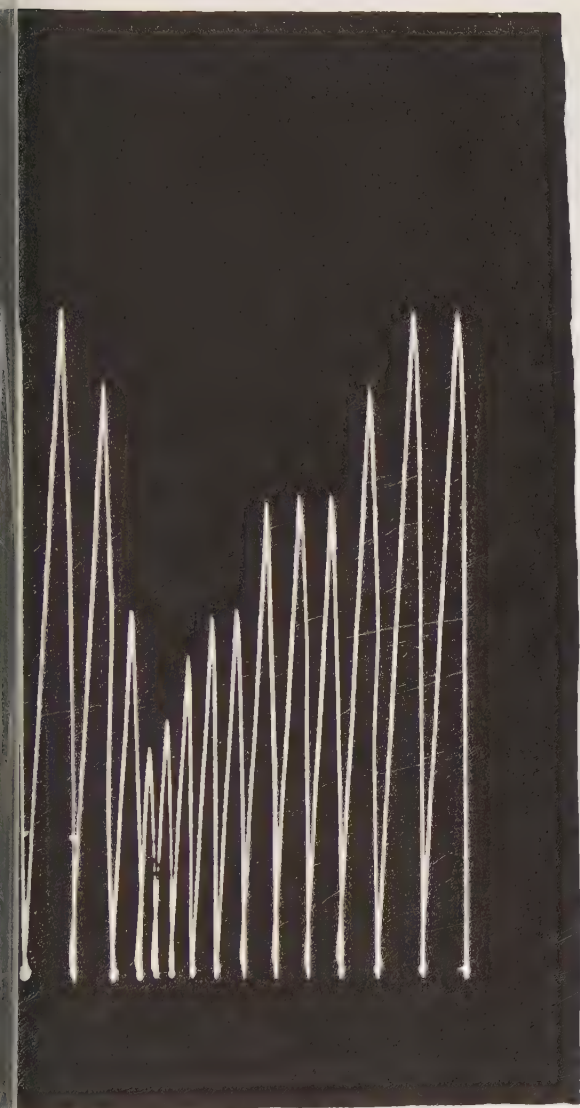
L'étude de l'association quaternaire, composée par les acides malique, citrique, succinique et H.M.A. à la dose de 10 mg/kg s'est révélée, comme lors de l'étude amphocholérétique, être le plus actif.

FIG. (F18) : MELANGE D'ACIDES.

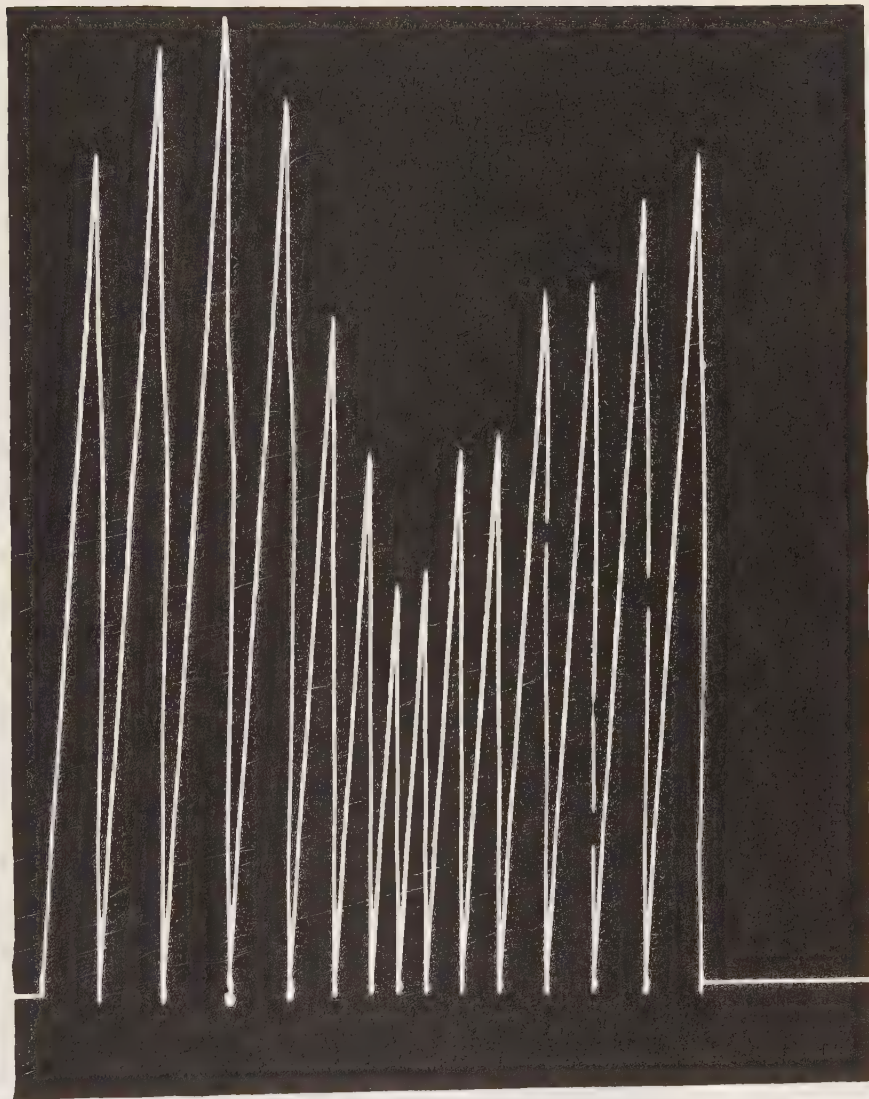


Acide glycérique 20mg/Kg aa
Acide glycolique

FIG (F19) MELANGE D'ACIDES.

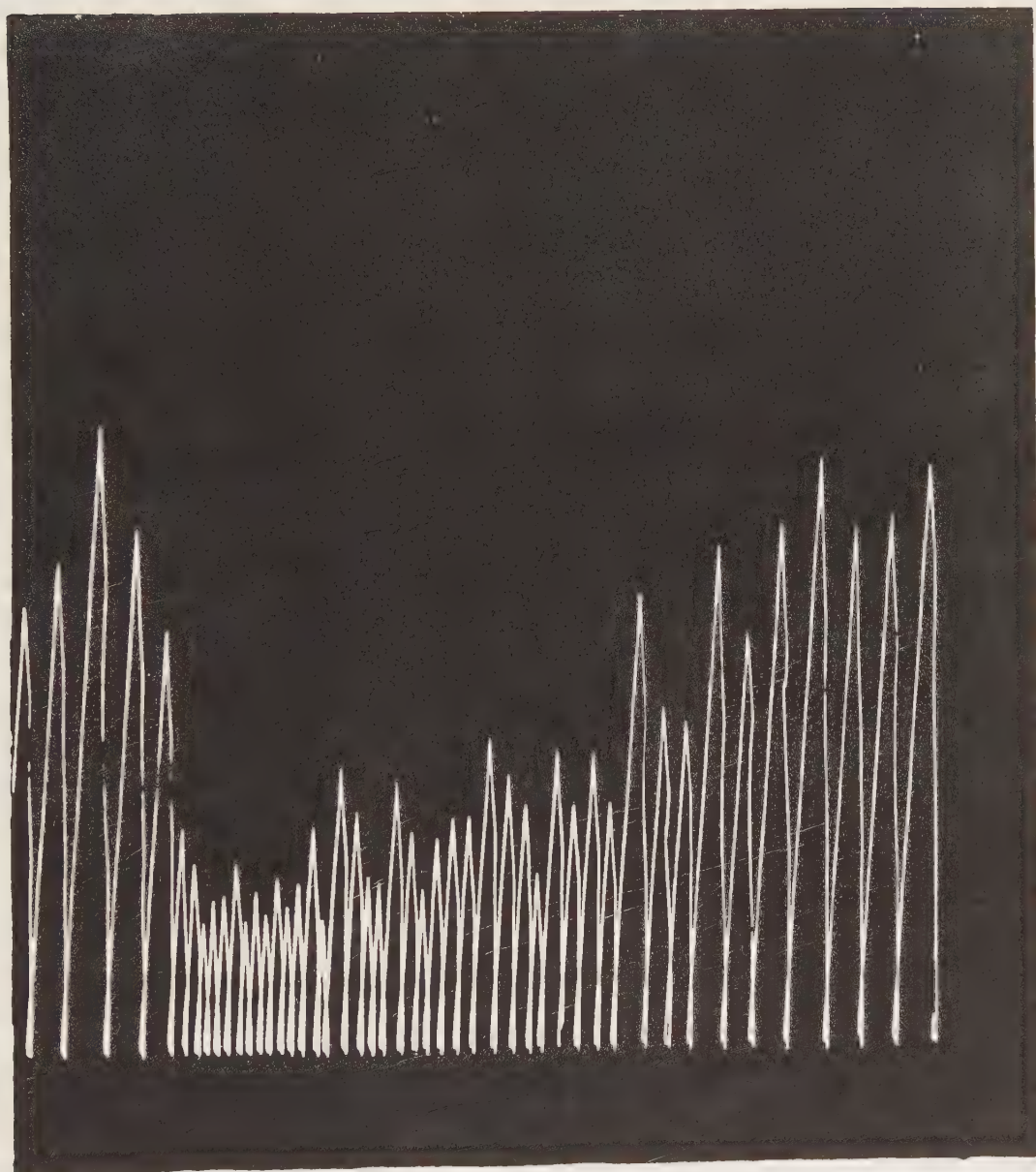


1) Acide malique
" citrique 13,3mg/Kg aa
" H.M.A.



2) Acide malique
" citrique 13,3mg/Kg aa
" succinique

FIG (F20): MELANGE D'ACIDES.



Acide malique
Acide succinique 13,3mg/Kg aa
Acide H.M.A.

La figure F 21 visualise l'activité diurétique de ce mélange, et met en évidence une augmentation du flux urinaire de 246 % pendant 42 minutes 30 secondes.

Nous avons étudié avec plus de précision ce mélange quaternaire et notamment la variation du flux urinaire en fonction de doses croissantes administrées par voie intraveineuse (Fig. F 22).

Ceci permet de comparer l'activité de cette association à différentes doses et de vérifier leur efficacité diurétique.

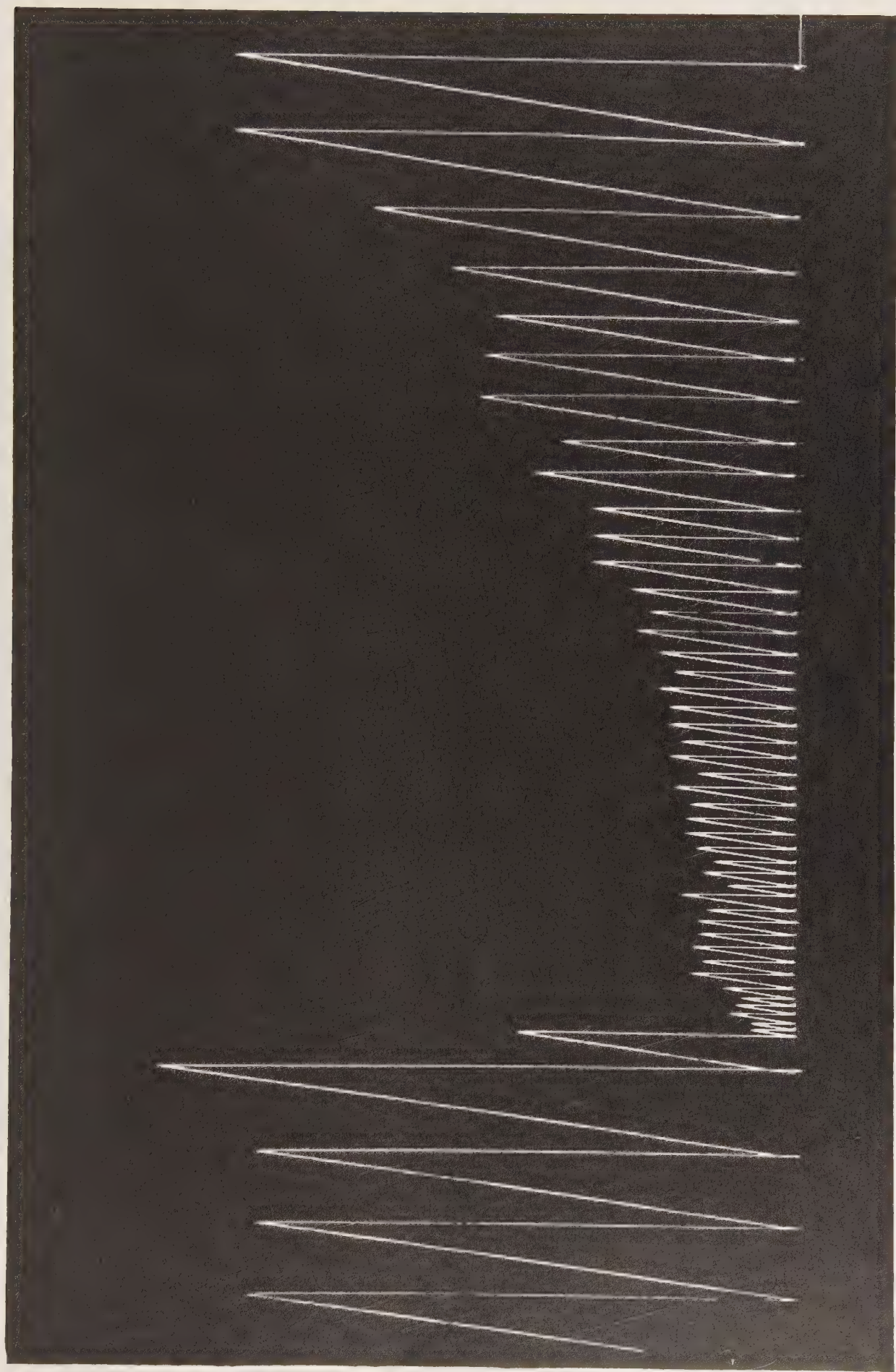
Le tableau T 21 indique les doses utilisées et les réponses obtenues, la figure F 23 en résume les résultats.

Quant aux mélanges composés des 5 ou 6 acides utilisés aux doses de 8 mg $\hat{a}\hat{a}$ /kg et 6,6 mg $\hat{a}\hat{a}$ /kg, ils ne semblent pas améliorer l'activité diurétique comme en témoigne la figure F 24 dont le pourcentage d'augmentation pour un mélange aux doses de 6,6 mg $\hat{a}\hat{a}$ est de 107 % et la durée de 26 minutes 30 secondes. On constate au contraire une réduction de l'effet diurétique, sans doute consécutif à la réduction de 10 mg à 6,6 mg aa, des quatre acides fondamentaux testés.

IV - DISCUSSION DES RESULTATS

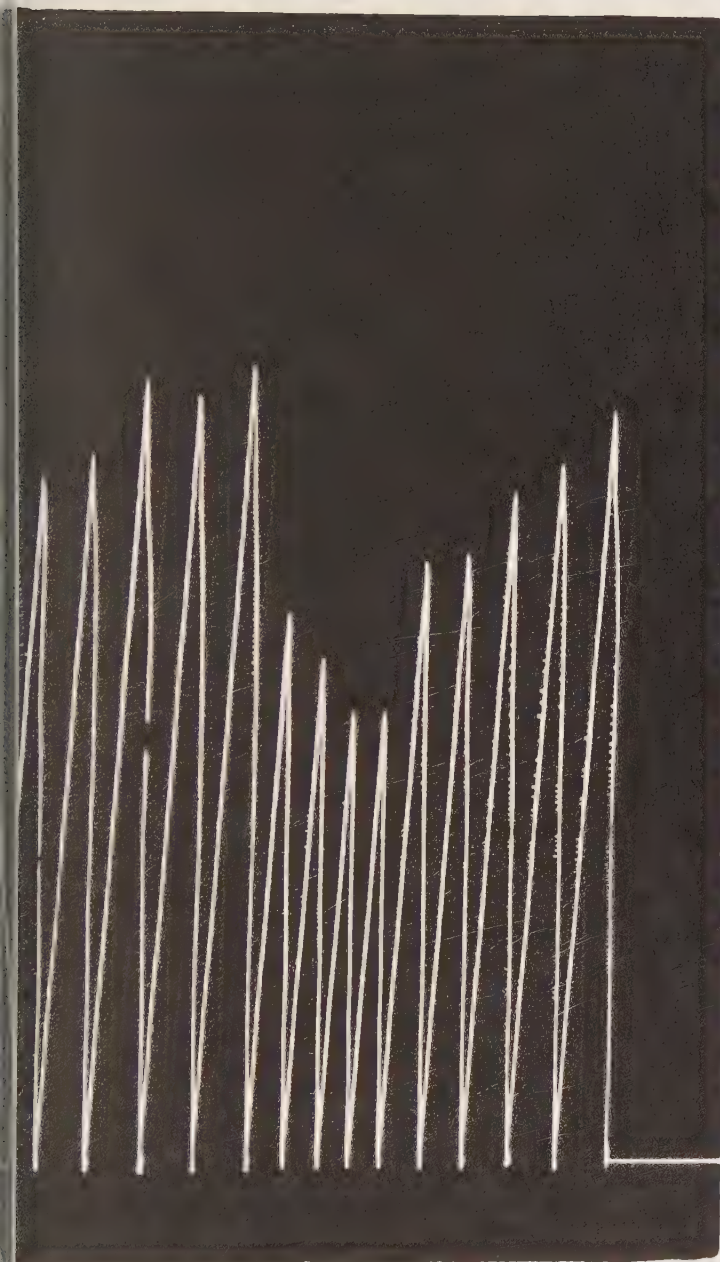
Le graphique F 25 résume les diverses activités de ces acides et de leurs associations. Nous avons représenté en abscisse la durée d'activité du produit et en ordonnée le pourcentage du flux urinaire émis pendant ce temps ; les rectangles ainsi obtenus sont représentatifs de l'activité des divers acides ou mélanges testés.

FIG. (F21): MELANGE D'ACIDES.

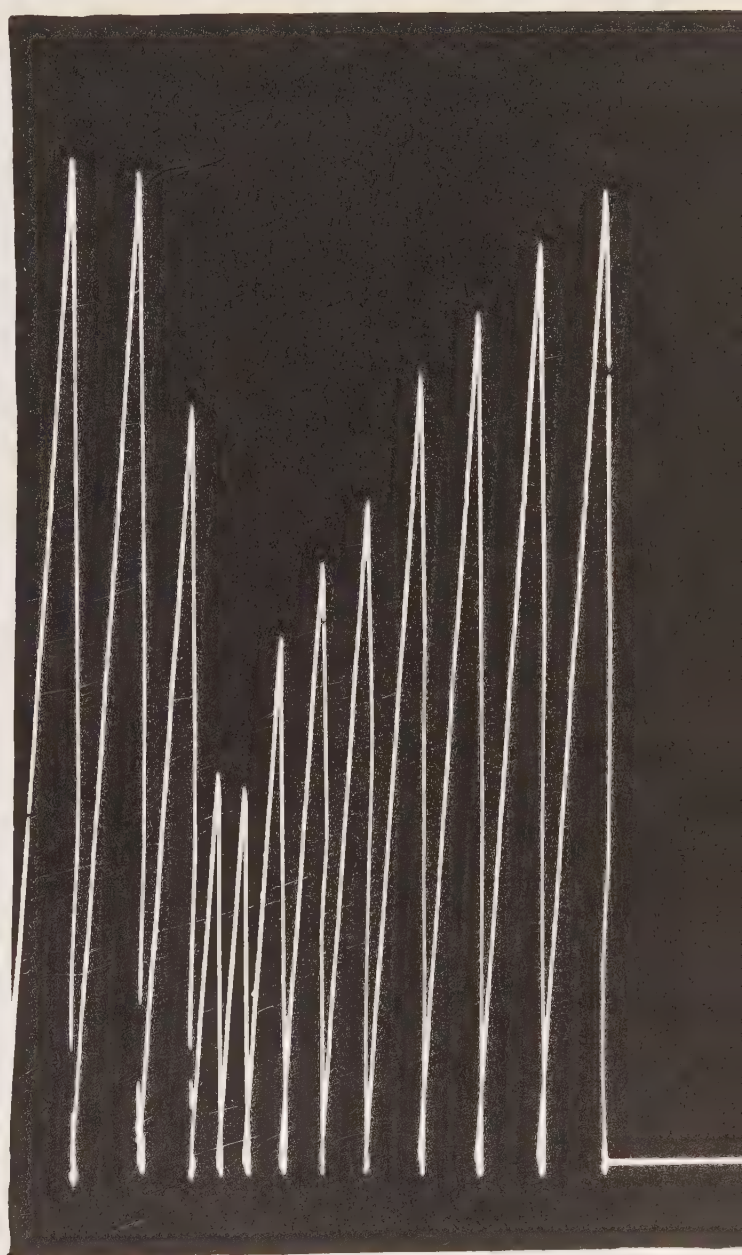


Acides malique, citrique, succinique, H.M.A. 10mg/Kg aa

FIG (F22): MELANGE D'ACIDES.



1) Acide malique
 " citrique 2mg/Kg aa
 " succinique
 " H.M.A.



2) Acide malique
 " citrique 5mg/Kg aa
 " succinique
 " H.M.A.

T A B . (T 2 1)

EFFET DIURETIQUE DU MELANGE QUATERNAIRE : ACIDES MALIQUE,
CITRIQUE, SUCCINIQUE ET H.M.A. (10 mg/kg aa)

: DOSES UTILISEES EN mg/kg :	% D'AUGMENTATION :	DUREE :
:	:	:
: 2	: 26	: 11' 45" :
: 5	: 70	: 13' 45" :
: 7	: 135	: 22' :
: 10	: 246	: 42' 30" :
: 15	: 260	: 44' :
: 20	: 260	: 42' :
:	:	:

FIG.(F23): COURBE D'ACTIVITE DIURETIQUE DU MELANGE QUATERNAIRE

d'augmentation

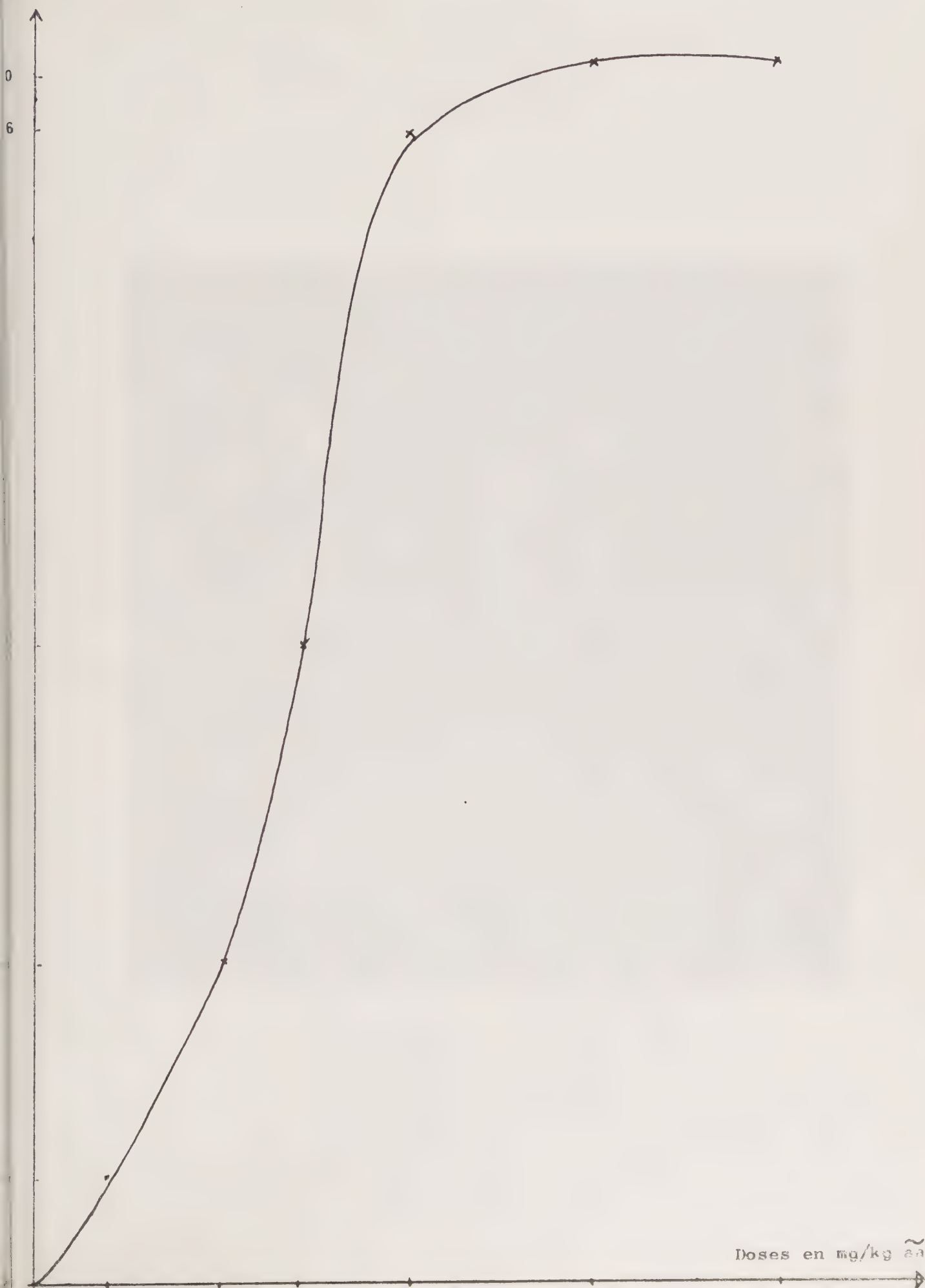
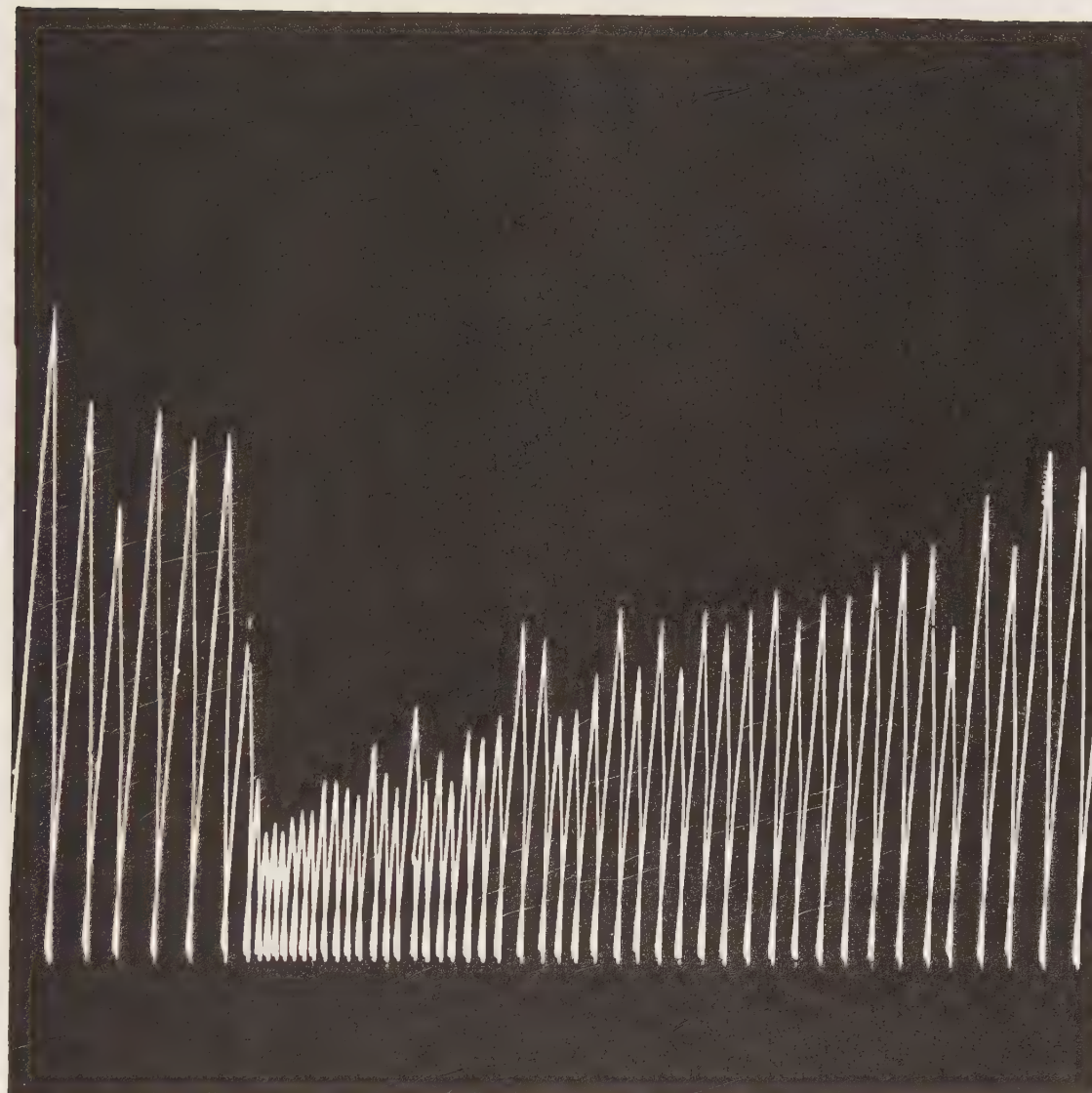


FIG.(F24): MELANGE D'ACIDES.



Acide malique	
" citrique	
" succinique	
" glycérique	6,6mg/Kg aa
" glycolique	
" H.M.A.	

FIG.(F25) : ACTIVITE DIURETIQUE DES ACIDES ET DE LEURS ASSOCIATIONS EXPRIMEE EN %

% d'augmentation

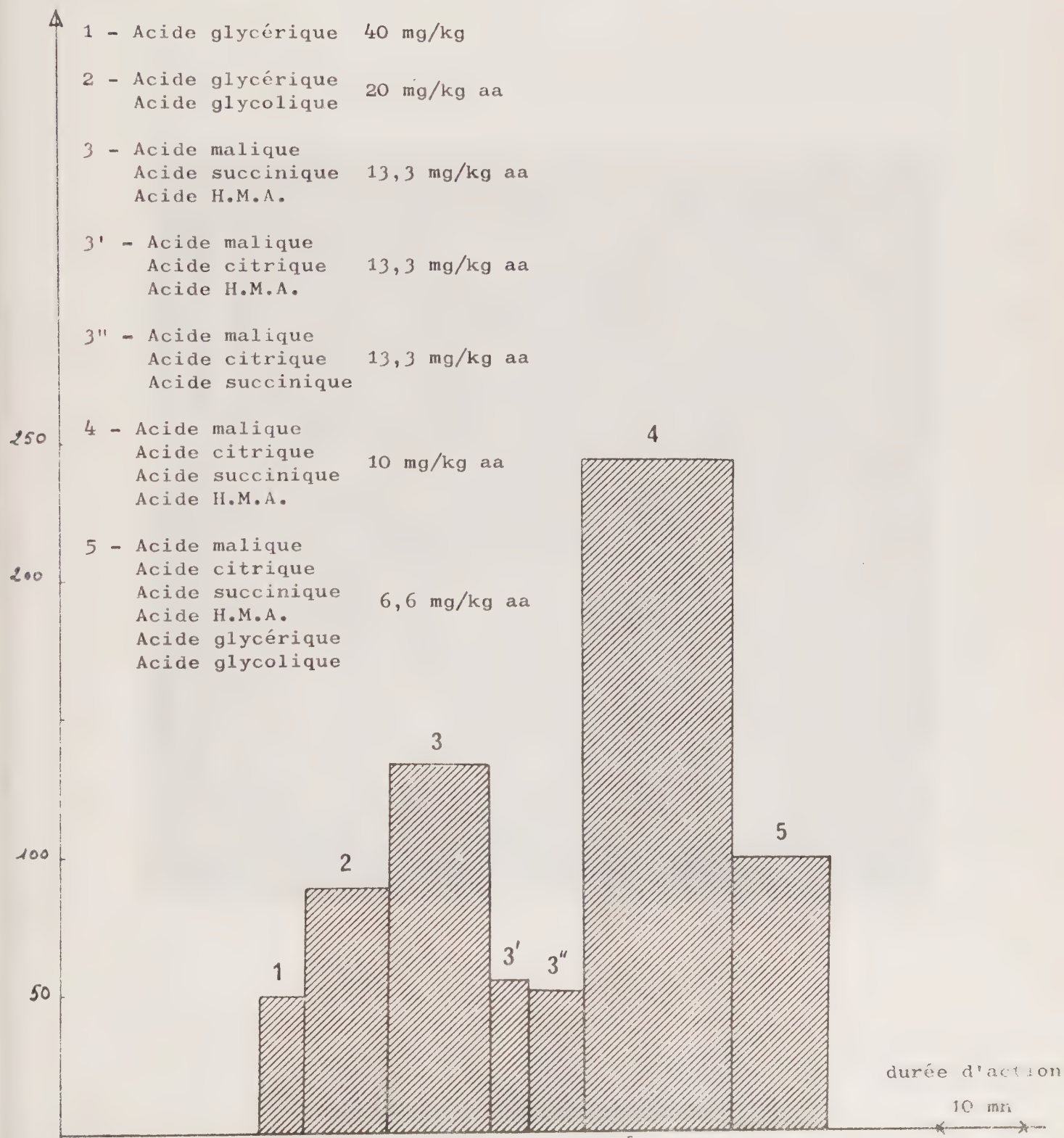
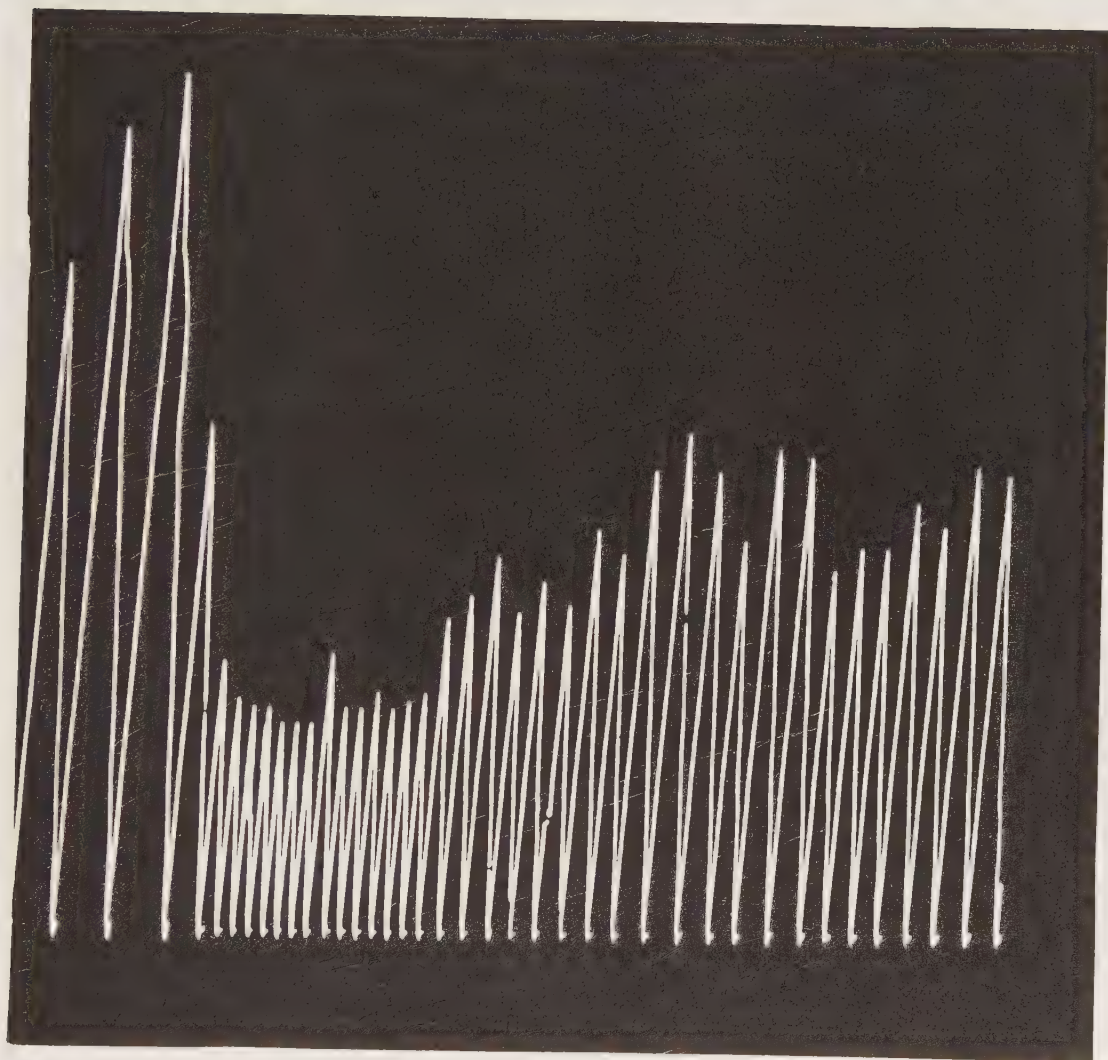
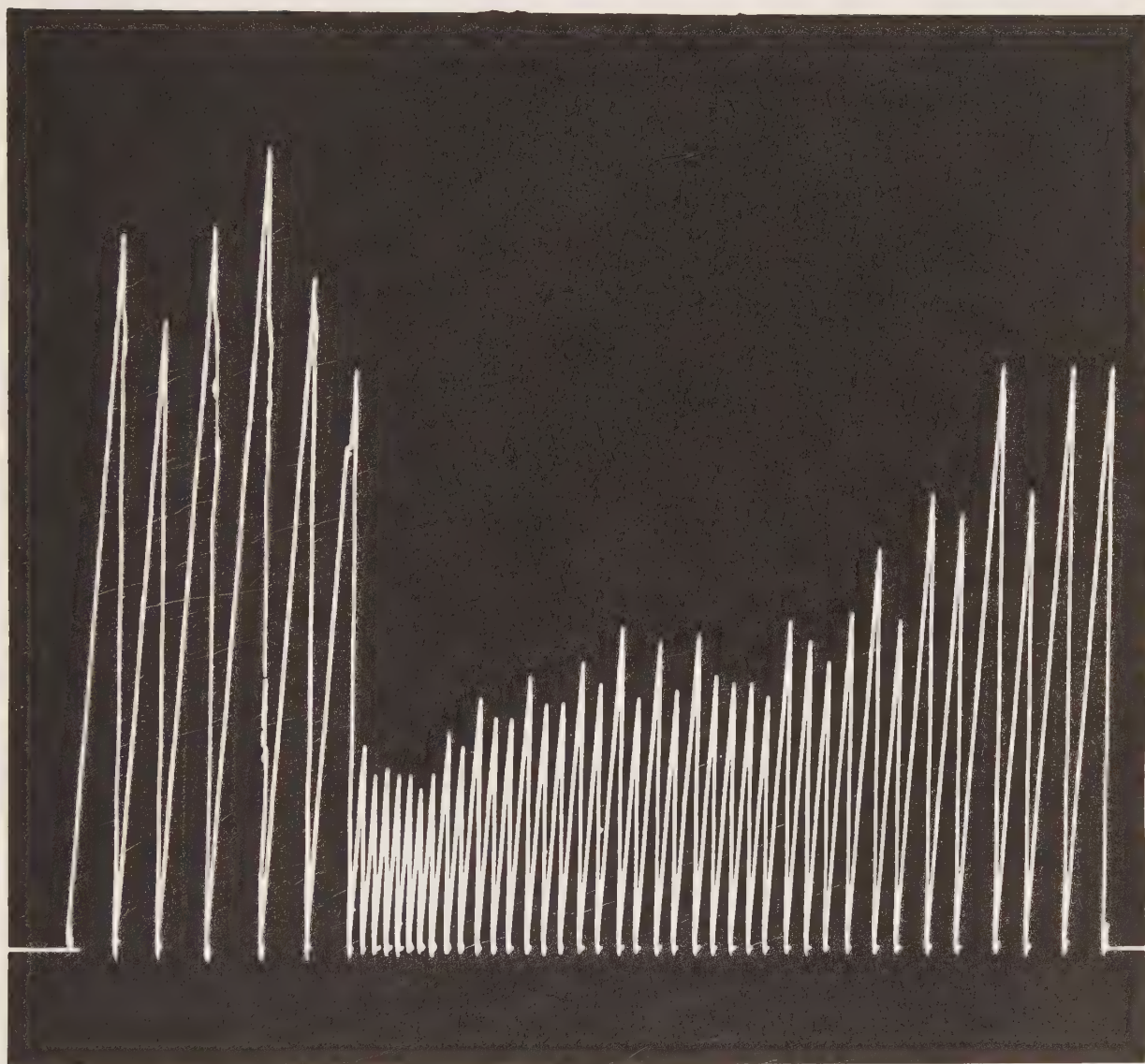


FIG (F26) EXTRAIT D'ARTICHAUT.



Extrait obtenu après hydrolyse. 40mg/Kg

FIG. (F27) EXTRAIT D'ARTICHAUT.



Extrait obtenu sans hydrolyse préalable. 40mg/Kg

Dans ces conditions, il est facile de constater que le mélange quaternaire constitué par l'association des acides malique, succinique, citrique et H.M.A. à la dose de 10 mg $\tilde{\text{a}}$ /kg de poids d'animal, se révèle être le plus efficace sur la diurèse. Ces résultats sont en parfaite corrélation avec ceux obtenus lors de l'étude des propriétés amphocholérétiques de ces mélanges acides, puisque ce mélange quaternaire, à la dose de 10 mg $\tilde{\text{a}}$ s'avérait également le plus actif. L'efficacité de cette association confirme bien l'activité hépatorénale de ce mélange et l'attrait de certaines plantes en médecine populaire le contenant.

V - ACTION DIURETIQUE DES EXTRAITS BUTANOLIQUES D'ARTICHAUT

Nous avons utilisé la même technique expérimentale afin de tester l'effet diurétique des divers extraits butanoliques d'Artichaut.

1) - Préparation des extraits

Comme lors de l'étude de l'activité amphocholérétique, les extraits, débarrassés du butanol par distillation sous pression réduite, sont salifiés à l'aide d'une solution de bicarbonate de sodium et alcalinisés à pH 7,1.

Les solutions sont alors injectées par voie intraveineuse dans la jugulaire du lapin à raison de 40 mg par kilo de poids d'animal.

2) - Résultats et discussion

Nous avons ainsi testé les extraits d'Artichaut obtenus après hydrolyse alcaline, acide et également sans hydrolyse préalable.

Dans tous les cas, l'action diurétique est manifeste comme en témoignent les enregistrements suivants (Fig. F 26 et F 27).

L'augmentation de la diurèse est de 135 % dans le cas de l'extrait obtenu sans hydrolyse alors que cette dernière n'est que de 64 % après injection d'extrait obtenu après hydrolyse alcaline ou acide.

Ces faits sont en parfait accord avec les observations précédentes. En effet, on avait constaté que le rendement d'extraction obtenu à partir de 20 g de plantes sèches, était meilleur sans pratiquer d'hydrolyse, ce qui laisse supposer une plus forte concentration de ces acides dans l'extrait non hydrolysé et de ce fait une activité diurétique plus importante.

VI - BILAN IONIQUE URINAIRE

Nous avons déterminé, sur les urines recueillies au cours des expérimentations précédentes, les taux de Na^+ , K^+ et Cl^- afin d'apprécier les variations de la teneur de ces divers ions au cours de la diurèse. Notre objectif était de savoir s'il y avait une élimination différentielle ou si, au contraire, la composition ionique de l'urine restait inchangée quelque soit le volume émis.

1) - Protocole de dosage

Les urines sont recueillies dans des tubes en verre neutre et le pH est noté. Une partie aliquote, diluée au 1/500, servira au dosage du Na^+ et K^+ par spectrophotométrie de flamme. Les chlorures seront dosés par la méthode de VOTOCLEK.

2) - Expression des résultats

Nous avons dosé les ions Na^+ , K^+ et Cl^- sur les urines recueillies après injection des acides glycolique (40 mg/kg), glycérique (40 mg/kg), H.M.A. (40 mg/kg) et les mélanges d'acides glycolique et glycérique (20 mg/kg $\tilde{\text{aa}}$) ; citrique, succinique, malique et H.M.A. (10 mg/kg $\tilde{\text{aa}}$) ; citrique, succinique, glycérique et glycolique (8 mg/kg $\tilde{\text{aa}}$) et enfin l'extrait butanolique d'Artichaut.

En effet les expérimentations précédentes ont montré que seuls ces acides et certaines de leurs associations avaient une activité diurétique ; nous nous sommes donc limités à leur étude. Le tableau T 22 récapitule les résultats obtenus pour un exemple particulier : l'acide glycérique.

Avant l'administration de l'acide, un prélèvement d'urine de 8 cm³ permet de doser les trois ions. Ces 8 cm³ étant obtenus en 6 minutes et 30 secondes, il est donc aisé de calculer le débit urinaire.

L'injection intraveineuse d'acide glycérique à la dose de 40 mg/kg entraîne une augmentation de la diurèse, se manifestant par un accroissement du débit que nous exprimerons en pourcentage par rapport au débit ionique témoin.

3) - Discussion

A la lecture de ce tableau T 22, nous nous apercevons que les quantités d'ions émises par minute augmentent dans les mêmes proportions que les quantités d'urine ; Des constatations identiques peuvent être faites lors des injections des divers mélanges d'acides actifs ou de l'extrait d'Artichaut.

TAB. (T22) : BILAN IONIQUE DES URINES APRES INJECTION D'ACIDE GLYCERIQUE

N° du prélèvement	pH	Volume recueilli (en cm3)	Temps de prélèvement	Augm. en % du débit urinaire	Na ⁺		K ⁺		Cl ⁻	
					mg/mn	Augm. en % du débit de Na ⁺	mg/mn	Augm. en % du débit de K ⁺	mg/mn	Augm. en % du débit de Cl ⁻
Témoin 1	5,8	8	6'50"		3,7		0,37		9,4	
Injection 2	6,2	8	3'45"	84	6,88	86	0,67	81	16	80
3	6,4	8	4'45"	43	5,4	46	0,51	38	12	36
4	6	8	5'45"	18	4,06	10	0,40	8	10	8

Ainsi pouvons-nous conclure à une diurèse physiologique sans modification profonde du bilan ionique, en remarquant toutefois une légère dilution de l'urine à la fin de l'effet hyperdiurétique.

TROISIEME PARTIE

A P P L I C A T I O N D E S M E T H O D E S

A N A L Y T I Q U E S E T P H A R M A C O D Y N A M I Q U E S

A D ' A U T R E S D R O G U E S

Notre objectif, dans cette troisième partie, est d'appliquer les méthodes analytiques et pharmacodynamiques à d'autres espèces, réputées pour leur action hépatorénale, et de comparer les résultats ainsi obtenus à l'Artichaut.

Nous proposons donc d'y rechercher les acides et acides-alcools, d'en déterminer la nature et la teneur, et de mettre éventuellement en évidence des propriétés pharmacologiques similaires à celles des extraits d'Artichaut ou des mélanges d'acides déjà étudiés.

C H A P I T R E I

RECHERCHE ET DOSAGE DES ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS DANS DIVERSES DROGUES

A - APPROCHE PRELIMINAIRE

Lors de la mise au point des méthodes de recherche et de diagnose des acides et acides-alcools par C.C.M., nous avons opéré non seulement sur les extraits obtenus à partir de feuilles d'Artichaut, notre matériel d'étude, mais également à titre comparatif, sur un certain nombre d'espèces réputées pour leur activité hépatorénale.

Ces séries d'analyses chromatographiques, effectuées sur les plantes sèches, nous ont permis d'y retrouver quelques composés acides jusqu'alors non décrits. Nous avons séparé par C.C.M. les acides, en utilisant le solvant (acide formique-formiate d'éthyle-toluène-10-40-50 V/V).

Ces résultats, figurant dans le tableau T 23, nous montrent que pour chaque espèce étudiée un ou plusieurs acides et acides-alcools ont pu être ainsi mis en évidence. Il ne s'agit là que d'une approche très sommaire et purement qualitative où n'est mentionnée que la présence ou l'absence de ces acides.

On pouvait imaginer que ces constituants, faisant partie des métabolismes fondamentaux du règne végétal, seraient susceptibles d'être mis en évidence dans n'importe quelle espèce grâce aux méthodes analytiques utilisées. Or, l'expérience nous a prouvé qu'il n'en était rien. En effet, les quatorze espèces figurant au tableau T 22 n'ont pas été les seules étudiées ; nous avons, en fait, élargi notre investigation à une

TAB (723) : RECHERCHE DES ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS DANS DIVERSES DROGUES REPUTÉES

POUR LEUR ACTION HEPATORENALE

PLANTES A REPUTATION DIURETIQUE ET ACTION HEPATORENALE			ACIDES-ALCOOLS				
FAMILLE	ESPECES	Partie employée	Acide glycolique	Acide glycérique	Acide malique	Acide succinique	Acide citrique
Légumineuses	Bugrane Ononis spinosa	racine					+
Rosacées	Ulmairé Spirae a Ulmaria	fleurs					
Ombellifères	Fenouil Foeniculum dulce	fruit		+			+
Ombellifères	Persil Petroselinum sativum	fruit		+			+
Ombellifères	Panicaut Eryngium campestre	racine	+	+			
Solanacées	Alkékenge Physalis Alkekengi	fruit	+		+	+	+
Composées	Carline Carlina acaulis	racines	+		+	+	+

PLANTES A REPUTATION DIURETIQUE ET ACTION HEPATORENALE			ACIDES-ALCOOLS				
FAMILLE	ESPECES	Partie employée	Acide glycolique	Acide glycérique	Acide malique	Acide succinique	Acide citrique
Composées	Lampsane <i>Lampsana communis</i>	feuilles					
Composées	Bardane <i>Arctium majus</i>	racine feuilles	+	+	+		+
Graminées	Maïs <i>Zea Mays</i>	styles	+	+	+		+
Graminées	Chiendent <i>Agropyrum repens</i>	rhizome	+	+	+		+
Liliacées	Scille <i>Urginea scilla</i>	bulbe	+	+			
Liliacées	Petit houx <i>Ruscus aculeatus</i>	rhizome	+	+			+
Liliacées	Oignon <i>Allium Cepa</i>	bulbe	+	+	+		+

+ = acides décrits dans la bibliographie

/// = acides nouvellement mis en évidence

longue liste de drogues relevées dans divers ouvrages de médecine traditionnelle. Il est apparu, que, dans un bon nombre d'entre elles, la méthode employée ne permettait d'identifier aucun acide ou, dans certains cas, un ou deux acides seulement.

Tel était le cas des espèces suivantes :

- La Digitale (Digitalis purpurea, L. Scrofulariacées)
- La Bourrache (Borrago officinalis, L. Borraginacées)
- Le Gremil (Lithospermum officinale, L. Borraginacées)
- Le Marrube (Marrubium vulgare, L. Labiées)
- L'Epine vinette (Berberis vulgaris, L. Berbéridacées)
- Le Souci (Calendula arvensis, L. Composées)
- Le Baguenodier (Collutea arborescens, L. Légumineuses)
- Le Roseau aromatique (Acorus calamus, L. Aracées)
- La Primevère (Primula officinalis, L. Primulacées)

Bien entendu la carence en acides-alcools de ces drogues, tout au moins en quantité telle qu'ils puissent être identifiés par les méthodes utilisées, ne signifie nullement l'absence de propriétés pharmacologiques. Il est notoire, par exemple, que la Digitale doit ses propriétés diurétiques à l'augmentation de l'irrigation rénale consécutive à l'action de ces hétérosides cardiotoniques. On peut également attribuer l'action diurétique des Borraginacées et du Marrube à leur teneur toujours élevée en nitrate de potasse.

Dans d'autres cas, il semble que l'on puisse évoquer la théorie des signatures pour expliquer les usages constants de certaines drogues dans les affections du foie. Tel est

le cas de l'Epine vinette, voire de la Primevère et du Souci, dont la coloration jaune des organes végétatifs et floraux évoquent l'ictère. En poussant plus avant ce raisonnement, il n'est pas interdit de voir dans l'utilisation du roseau, en tant que diurétique, la conséquence d'une signature, car le roseau est traditionnellement associé à l'idée de l'eau.

Cependant, quels que puissent être les éventuels principes actifs de ces drogues, leur activité ne peut en aucune manière être rattachée à leur teneur en acides et acides-alcools aliphatiques.

Nous avons en effet noté, dans nos expérimentations précédentes, qu'une activité pharmacologique des extraits ne se manifestait que dans la mesure où plusieurs acides et acides-alcools coexistaient simultanément et en quantité suffisante.

Or cela n'a jamais été le cas pour les espèces qui viennent d'être citées. Si l'acide malique est généralement présent en faible quantité, nous ne le trouvons jamais associé à deux ou trois acides.

Afin de pousser plus avant nos investigations préliminaires, nous avons cru utile d'effectuer quelques tests sommaires sur des espèces notoirement dépourvues de réputation thérapeutique ; tout au moins en ce qui concerne les effets hépatorénaux. Ainsi, avons-nous choisi les parties aériennes de Poa annua (Graminées) et de Paquerette (Bellis perennis, L. Composées). Dans ces deux cas particuliers nous n'avons pu mettre en évidence aucun de ces composés acides.

Dans ce même ordre d'idée, nous avons étudié les

extraits obtenus à partir de la pomme (Pirus malus, L. Rosacées) ; si ce fruit est riche en acide malique, il ne contient en revanche que des traces d'acide citrique et aucun des autres acides de nos séries. On conçoit alors aisément son inactivité dans cette sphère d'activité thérapeutique.

B - SELECTION D'ESPECES SUPPOSEES ACTIVES

Nous avons effectué ces approches préliminaires au début de notre travail, lorsque nous avons réussi à mettre au point une méthode d'extraction simple et complète et un bon système de solvant pour la séparation des acides-alcools par C.C.M.. Ayant ensuite pu mettre en évidence des propriétés pharmacologiques de l'extrait d'Artichaut et des mélanges d'acides-alcools qu'il contient, nous avons sélectionné un certain nombre d'espèces, dont nous avons des raisons particulières de penser qu'elles pouvaient présenter une composition chimique analogue à celle de l'Artichaut et par voie de conséquence, des propriétés pharmacologiques semblables.

I - CHOIX DES DROGUES

Sept espèces ont été ainsi sélectionnées, et ont fait l'objet d'une étude analytique et d'une expérimentation pharmacodynamique effectuées suivant les méthodes exposées précédemment.

Trois composées ont été ainsi retenues : la racine de Bardane (Arctium majus, Bernh Composées), les feuilles d'Eupatoire (Eupatorium cannabinum, L. Composées) et de Piloselle (Hieratium pilosella, L. Composées).

Les deux premières, réputées pour leur action diurétique et hépatique, présentent des particularités chimiques intéressantes qui les rapprochent singulièrement de l'Artichaut. En effet la Bardane et l'Eupatoire contiennent des principes amers : l'Arctiopicrine (SUCHY, 1959) et l'Eupatoriopicrine (DOLEJS, 1962), tous deux dérivés du germacrane et qui sont respectivement les esters des acides méthyl-2-propanol-3 oïque et butène-2 diol 2,4 oïque. Ces deux acides sont proches de l'acide α hydroxyméthylacrylique de l'Artichaut, l'un en étant le composé hydrogéné et l'autre l'homologue supérieur.

La troisième composées choisie est la Piloselle, espèce notoirement diurétique puisque utilisée à ce titre dans diverses préparations et spécialités pharmaceutiques. Cependant cette espèce ne présente pas des similitudes chimiques identiques aux précédentes, il était dès lors particulièrement intéressant d'y rechercher et d'y doser les acides et acides-alcools, qui peuvent en constituer un des groupes de principes actifs.

Dans la famille des Labiées, notre choix s'est porté sur l'Orthosiphon (Orthosiphon stamineus, Labiées), espèce puissamment diurétique et utilisée de très longue date en Indes et en Indonésie et dont les propriétés pharmacologiques ont parues suffisamment affirmées pour que la drogue soit inscrite pour la première fois à la Pharmacopée Française en 1965. En 1934, KELLER ayant décrit dans cette espèce les acides tartrique et citrique à l'état de traces, il était donc particulièrement intéressant de voir si notre complexe acide-alcool pourrait y être mis en évidence.

La cinquième drogue sélectionnée est le Fumeterre (Fumaria officinalis, L; Fumariacées), dont les nébulisats ont conduit BOUCARD (1966) à décrire pour la première fois les effets amphocholérétiques. Il était donc naturel d'y rechercher le bloc acide dont nous avons pu constater qu'il était, en partie du moins, responsable de cette activité dans l'Artichaut.

Nous avons enfin sélectionné deux espèces, la première étant le Maïs (Zea mays, L. Graminées) traditionnellement reconnu comme diurétique et le Boldo (Peumus boldus, M. Monimiacées) classiquement cholérétique.

BALANSARD (1952) avait mis en évidence, dans les styles de Maïs, les acides glycérique et glycolique, tandis que NELSON et MOTTERN (1931) avaient signalé la présence dans cette espèce des acides oxalique, malique, citrique, aconitique et tricarballoylique. Il était donc logique de penser que cette série d'acides puissent être tenus pour responsables, en partie du moins, de l'activité de la drogue.

Quant au Boldo, drogue diurétique mais aussi cholérétique, il était intéressant de vérifier si le bloc des acides-alcools contribue, en partie tout au moins, à l'activité hépatique à côté des principes actifs tenus pour responsables de cette action, c'est-à-dire les alcaloïdes aporphiniques et l'huile essentielle riche en Cinéol. En effet, si l'on sait que le Cineol possède de légères propriétés cholérétiques (YOUNOS C., 1971), aucun acide-alcool n'a jamais été signalé dans cette espèce.

II - ESTIMATION ET ANALYSE QUANTITATIVE

Les extraits butanoliques de ces sept drogues, obtenus sans hydrolyse préalable, ont été soumis à la C.C.M. dans le solvant acide, puis après révélation par les réactifs spécifiques et comparaison de chacun d'eux à une gamme témoin, nous avons tenté d'apprécier grossièrement leur proportion respective par simple lecture des chromatogrammes et de les comparer à l'Artichaut.

Les résultats figurent dans le tableau T 24 où nous avons regroupé les acides et acides-alcools en trois groupes.

Le premier groupe correspond aux acides de la glycolyse anaérobie (acides glycolique, glycérique, lactique) dont les deux premiers possèdent une certaine activité diurétique.

Le second groupe correspond aux acides du cycle de KREBS (acides malique, succinique, citrique, fumarique) et le troisième contient des acides particuliers du métabolisme des Composées (H.M.A. : acide α hydroxyméthylacrylique, H.I.B. : acide β hydroxyisobutyrique, D.H.M.A. : acide 0- α dihydroxyméthylacrylique).

Ces trois séries d'acides, regroupés en fonction des cycles biologiques auxquels ils appartiennent, peuvent être par ailleurs réunis en séries pharmacologiques, ceci en fonction des propriétés mises en évidence dans la deuxième partie. Il y a lieu ainsi de distinguer le groupe des acides glycolique et glycérique, responsables exclusivement d'une assez faible activité diurétique et le groupe des acides malique, succinique,

TAB. (T24) : TENEUR EN ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS

DE DIVERS EXTRAITS OBTENUS SANS HYDROLYSE

ACIDE DE LA GLYCOLYSE ANAEROBIE				ACIDE DU CYCLE DE KREBS				ACIDES PARTICULIERS		
Drogues sèches	Lactique	Effets diurétiques		Fumérique	Effets détoxifiants, amphocholérétiques et diurétiques			H.M.A.*	H.I.B.*	D.H.M.A.*
		glycolique	glycérique		succinique	malique	citrique			
Artichaut	+++	++	+	+	+++	++++	++	+++		
Eupatoire	++	++	+	+	++	++	+			++
Bardane	++++	++	+		++	++	+		++	
Piloselle	++	+		+++			+			
Boldo	+	++	++	+	++	++	+			
Orthosiphon	+	++	++		++	+	+			
Maïs	+++	++	++		++	+	++			
Fumeterre	++	+	+	+++	+	+++	++			

* H.M.A. = acide α -hydroxyméthylacrylique

* H.I.D. = acide β -hydroxyisobutyrique

* D.H.M.A. = acide O- α -dihydroxyméthylacrylique

citrique et H.M.A. responsables tout à la fois des effets diurétiques, amphotcholérétiques et détoxifiants.

La lecture du tableau T 24 appelle les observations suivantes :

- Toutes les drogues testées possèdent la quasi totalité des acides actifs en des proportions telles qu'il a été possible de les repérer sur les chromatogrammes, à l'exception de la Piloselle qui n'accumule ni acide succinique, ni acide glycérique et peu d'acide glycolique.

- Une seconde constatation s'impose : si l'on compare ces sept drogues à l'Artichaut, on constate que ce dernier est le plus riche en acides et acides-alcools, dont il possède à la fois le plus grand nombre et la proportion la plus élevée pour la quasi totalité d'entre eux. Ces observations justifient ainsi, a posteriori, le choix de cette drogue pour la mise au point des méthodes d'études analytiques et pharmacodynamiques des espèces riches en acides aliphatiques.

- S'il est difficile de pousser plus avant l'analyse de résultats aussi grossiers, on peut conclure à une prédominance des composées acides dans l'extrait d'Artichaut et une nette déficience dans celui de la Piloselle ; les autres espèces se regroupant entre ces deux extrêmes.

Une estimation aussi grossière ne nous permet pas d'envisager des relations entre la composition chimique et les effets pharmacodynamiques avec une précision suffisante. C'est la raison pour laquelle nous avons jugé nécessaire d'entreprendre le dosage des principaux acides-alcools dans les drogues sélectionnées.

Le dosage des acides malique, citrique et lactique ne fait aucun problème, puisque nous avons pu constater que la méthode par voie enzymatique donne d'excellents résultats, fidèles et reproductibles ; nous les appliquerons donc aux sept drogues étudiées.

Cependant, ayant pu mettre en évidence l'importance de la série chimique constituée par les acides malique, succinique, citrique et H.M.A., il nous paraissait important de préciser les quantités des acides succinique et H.M.A. présents dans certaines drogues. Faute d'une méthode appropriée, nous nous sommes efforcés de rendre aussi quantitatif que possible l'appréciation de la teneur en acide succinique et H.M.A. par la technique de chromatographie gaz liquide, avec toutes les réserves qui ont été faites précédemment à l'égard de cette méthode.

Ayant opéré de façon rigoureusement similaire pour les sept drogues étudiées, les résultats obtenus, s'ils peuvent être entachés d'erreur, sont tout au moins comparatifs pour chaque acide étudié. Ainsi nous avons pu apprécier la surface des pics, correspondant aux acides succinique et H.M.A. par rapport à une gamme étalon de chaque composé. Cependant, faute de témoins, les acides β -hydroxyisobutyrique et O- α -dihydroxyméthylacrylique ont été exprimés en H.M.A. après planimétrie des pics. Pour ces deux derniers acides, les résultats ont donc une valeur toute relative.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau T 25 où l'on a fait également figurer les valeurs trouvées lors des dosages enzymatiques des acides malique, citrique, lactique.

Si la diversité des méthodes de dosages employées ne permettent pas une bonne comparaison entre les cinq différents acides, en revanche il est possible de comparer les divers taux d'un même type d'acide contenu dans les sept drogues étudiées.

La confrontation de ce tableau avec nos estimations quantitatives montre une assez bonne corrélation des résultats. Il faut cependant signaler quelques cas aberrants : le Fumeterre semble contenir plus d'acide citrique que ne le laissait prévoir l'estimation quantitative précédente, et l'Eupatoire moins d'acide malique.

Il faut signaler également que la Piloselle contient de l'acide tartrique inhibiteur de l'aconitase (SIEBERT, 1963) ce qui rend impossible le dosage de l'acide citrique dans cette espèce. C'est un nouvel exemple des inhibitions enzymatiques qui rendent, dans certains cas, les dosages impossibles.

Les taux d'acide lactique sont également relativement constants, sauf pour la Bardane mais il s'agit dans ce cas de racines. De même, les quantités d'acide citrique sont assez comparables sauf pour le Fumeterre, et à un degré moindre pour l'Artichaut où ces taux sont assez importants. Par contre les quantités d'acide malique sont très variables et, là encore, l'Artichaut et le Fumeterre se révèlent être des plus riches.

Il était également intéressant d'apprécier les pourcentages de ces acides par rapport à leurs proportions respectives. Ces résultats sont résumés dans les tableaux T 25 et

TAB. (125) : TAUX DES DIVERS ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS

EXPRIMES EN mg % DE PLANTE SECHE

Droque sèche	Dosages enzymatiques			Dosages par chromatographie			
	Malique	citrique	lactique	succinique	H.M.A.*	H.I.B.*	D.H.M.A.*
Artichaut	1220	5	19,2	40	25		
Eupatoire	63	2,5	11,2	12			10
Bardane	316	3	27,5	30		18	
Piloselle	349	-	12,5	2			
Boldo	238	2,2	12,5	19			
Orthosiphon	187	2,2	12	22			
Maïs	192	3,6	18	20			
Fumeterre	812	14,7	14	12			

* H.M.A. = acide α -hydroxyméthylacrylique

* H.I.B. = acide β -hydroxyisobutyrique

* D.H.M.A. = O- α -dihydroxyméthylacrylique

TAB.(T26):% DES DIVERS ACIDES ET ACIDES-ALCOOLS

EXPRIME PAR RAPPORT A LA QUANTITE TOTALE D'ACIDE

Droque sèche	Acide malique %	Acide citrique %	Acide succinique %	Acide H.M.A. %	Acide H.I.B. %	Acide D.H.M.A. %	Acide lactique %	L/C*
Artichaut	93	0,40	3	1,9			1,5	3,8
Eupatoire	64	2,5	12			10	11,3	4,5
Bardane	80	0,76	7,6		4,5		7	9
Piloselle	96	-	0,55				3,4	-
Boldo	87	0,80	7				4,6	5,7
Orthosiphon	83	0,98	10				5,4	5,5
Maïs	82	1,6	8,6				7,7	5
Fumeterre	95	1,8	1,5				1,6	1

* H.M.A. = acide α -hydroxyméthylacrylique* H.I.B. = acide β -hydroxyisobutyrique* D.H.M.A. = acide 0- α dihydroxyméthylacrylique

T 26 où il apparaît que, dans le bloc de ces trois acides l'acide malique est toujours prédominant et représente au moins 64 %. Il semble donc être un des intermédiaires du cycle de KREBS le mieux accumulé. Il faut également signaler les variations corrélatives des acides citrique et lactique. En effet ce dernier terme ultime de la glycolyse anaérobie, ne peut s'accumuler que si l'acide pyruvique n'est pas transformé en acide citrique, inhibiteur du cycle de KREBS. Aussi le rapport lactique sur citrique (L/C Tableau T 26) peut, en augmentant, montrer une dominante de la glycolyse anaérobie, et à l'inverse, en diminuant montrer une facilitation du cycle aérobie. Le rapport lactique sur citrique (L/C) pourrait donc être considéré comme un témoin, de l'orientation métabolique de ces plantes et aussi expliquer certaines activités pharmacologiques qui seraient peut-être liées à l'accumulation de l'un ou de l'autre des acides du cycle aérobie ou anaérobie, selon que l'un ou l'autre de ces métabolismes est dominant. Ce point mériterait une étude plus poussée et nous devons en rester pour l'instant aux domaines des hypothèses.

ESSAIS PHARMACOLOGIQUES

C H A P I T R E I I

ESSAIS PHARMACOLOGIQUES

A - INTRODUCTION

Les résultats obtenus au cours des diverses expérimentations pharmacodynamiques et qui vont être exposés ci-dessous ne peuvent en aucune manière prétendre rendre compte à eux seuls des propriétés thérapeutiques effectives des espèces sélectionnées, car nous ne prenons pas en considération tous les principes actifs qu'elles peuvent contenir. Nous nous contentons en effet d'étudier les seuls acides et acides-alcools en comparant les effets pharmacodynamiques d'une quantité égale (40 mg) d'un mélange d'acides, isolé de chacune d'elles. Ces 40 mg d'extrait acide sont obtenus à partir de quantités variables de matière végétale sèche. C'est donc exclusivement la qualité thérapeutique du bloc acide de chaque espèce sélectionnée qui sera comparativement étudiée ici, car notre but tout au long de ce travail était d'étudier les propriétés thérapeutiques des "blocs acides", en tant que principes actifs de drogues naturelles et non pas les propriétés intrinsèques de ces mêmes drogues, dans lesquelles interviennent probablement d'autres éléments actifs. Seule la comparaison des propriétés thérapeutiques de ces "blocs acides" a un sens précis ; tout se passe comme si nous comparions les propriétés intrinsèques de divers principes actifs dont chacun serait constitué par un mélange complexe d'acides élémentaires. Pour connaître d'une manière approfondie les propriétés des drogues, il faudrait tenir compte de tous les principes connus

et inconnus qu'elles contiennent, de leurs proportions respectives et des potentialisations dont nous voyons, dans notre cas l'extrême importance. Des investigations chimiques et pharmacodynamiques aussi vastes dépasseraient évidemment le cadre de ce travail.

B - ACTION DIURETIQUE =====

Nous avons utilisé la méthode d'étude de la diurèse sur le lapin, afin d'étudier les sept espèces sélectionnées et de les comparer ainsi à la diurèse induite par l'extrait butanolique d'Artichaut.

I - PREPARATION DES EXTRAITS

Les extraits obtenus sans hydrolyse préalable sont débarrassés du butanol par distillation sous pression réduite, puis salifiés à l'aide d'une solution de bicarbonate de sodium et alcalinisés à pH 7.

Ces préparations sont alors injectées par voie intraveineuse dans la jugulaire du lapin à raison de 40 mg par kilo d'animal.

II - RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons testé des extraits^{et} comparé des diurèses à celles provoquées par l'extrait d'Artichaut. On exprime ainsi la durée d'activité diurétique et le pourcentage d'augmentation du flux urinaire par rapport au débit normal. Les résultats consignés dans le tableau T 27 concordent avec les estimations et dosages quantitatifs observés précédemment (Tableaux T 25 et T 26).

TAB (T27) TEMPS ET % D'AUGMENTATION DE LA DIURESE INDUITE PAR DIVERS
EXTRAITS DE PLANTE

DROGUE	TEMPS DE DIURESE	% D'AUGMENTATION
Beladonna	20'	135
Barroco	18' 30"	125
Esposito	16' 15"	110
Piloselle	5' 45"	40
Fumeterre	13'	88
Baldo	12' 30"	84
Maïs	15' 15"	103
Orthosiphon	16' 30"	111

En effet, les extraits d'Artichaut se révèlent être les plus actifs. Ce fait est à rapprocher de la constitution même du bloc acide de cette composée, plante possédant à la fois le mélange le plus riche (8 acides au total) et les teneurs les plus élevées pour les 4 acides dosés. A l'inverse l'extrait de Piloselle se révèle être le moins actif ; c'est aussi la drogue la plus pauvre en acides (4 acides présents seulement) et dans laquelle, de plus, l'acide glycérique fait défaut et l'acide glycolique n'est présent qu'en faible quantité ; or, nous avons montré que ces 2 acides possèdent, même pris isolément, une certaine activité diurétique. De plus, cette drogue ne possède pas d'acide succinique et peu d'acide citrique, or nous avons montré également que les propriétés diurétiques ne se manifestent que lorsque plusieurs acides du cycle de KREBS sont présents simultanément. Ces deux raisons expliquent parfaitement la faiblesse des effets diurétiques du bloc acide de la Piloselle, ce qui ne signifie pas l'inactivité intrinsèque de la drogue, dans laquelle d'autres principes diurétiques peuvent intervenir ; mais ce fait marque encore une fois le lien étroit entre la constitution des blocs acides et l'activité diurétique.

Les extraits obtenus à partir des 5 autres espèces donnent des résultats assez comparables ; le taux d'augmentation de la diurèse variant entre 84 % pour le Boldo et 125 % pour la Bardane. Il faut cependant noter que cette dernière drogue ainsi que l'Eupatoire possèdent toutes deux des dérivés de l'acide acrylique, hydrogénés ou non, qui peuvent être tenus pour responsables d'une activité diurétique plus marquée.

On peut logiquement donc estimer que les acides

méthyl-2 propanol-3 oïque et butène-2 diol 2,4 oïque interviennent comme potentialisateurs des effets diurétiques au même titre que l'acide α hydroxyméthylacrylique de l'Artichaut.

Il faut noter également les résultats médiocres obtenus avec les extraits de Boldo, résultats quelque peu surprenants, car on pouvait s'attendre à une activité diurétique plus importante, en raison de la richesse en acide et acide-alcool actifs de cet extrait (7 acides au total). Hormis ce cas, la concordance globale des effets diurétiques et des compositions chimiques est remarquable.

C - ROLE DETOXICANT VIS-A-VIS DU PENTOBARBITAL ET DE L'ALCOOL ETHYLIQUE

I - DIMINUTION DE LA DUREE DE SOMMEIL INDUITE PAR LE PENTOBARBITAL CHEZ LA SOURIS

Dans les essais pharmacologiques qui vont suivre, quelques espèces seulement ont été sélectionnées parmi la série des sept drogues examinées précédemment. En effet, notre objectif n'était pas tant de mener une étude exhaustive des propriétés pharmacologiques particulières du bloc acide de chaque espèce, mais de confirmer sur d'autres drogues les résultats obtenus pour l'extrait d'Artichaut et par conséquent les propriétés pharmacologiques des acides et acides-alcools le constituant.

Nous avons aussi soumis aux essais pharmacologiques les extraits butanoliques acides de 3 ou 4 espèces selon les cas. En ce qui concerne les effets détoxifiants, seuls les ex-

traits de Bardane, d'Eupatoire et de Fumeterre ont été examinés et comparés à l'Artichaut.

1) - Protocole expérimental

L'expérimentation a été conduite comme précédemment. Trois lots de 10 souris ont reçu par voie intrapéritonéale une dose de 10 mg/kg des divers extraits butanoliques préalablement débarrassés de butanol et salifiés à l'aide d'une solution de bicarbonate de sodium. Après un délai de 20 minutes, ces animaux reçoivent par la même voie une solution de pentobarbital à raison de 30 mg/kg.

2) - Résultats et discussion

Les moyennes de la durée de sommeil observée pour les différents groupes d'animaux sont les suivantes : après injection de l'extrait d'Eupatoire : 1050 secondes ; après injection de l'extrait de Bardane : 1300 secondes et 2010 secondes après l'injection de l'extrait de Fumeterre. L'extrait d'Artichaut réduisait la durée de sommeil à 980 secondes, tandis que les animaux témoins non traités dormaient 2495 secondes.

Les résultats figurant au tableau T 28 sont en outre faciles à comparer à ceux obtenus après injection du mélange d'acides (2,5 mg/kg $\hat{a}\hat{a}$). On remarque que si les extraits butanoliques des 3 Composées ont un effet détoxiquant puissant, les extraits de Fumeterre sont pratiquement inactifs. Or, dans nos expérimentations précédentes, nous avons constaté que l'action détoxiquante maximum était obtenue par l'association quaternaire des acides succinique, malique, citrique et H.M.A. à raison de 2,5 mg/kg $\hat{a}\hat{a}$; or l'analyse qualitative permet de remarquer l'absence, dans le Fumeterre, d'acide succinique et de H.M.A..

(T28): DIMINUTION DU TEMPS DE NARCOSE APRES INJECTION DES EXTRAITS BUTANOLIQUES
DE DIVERSES DROGUES

durée de sommeil
en secondes)

Groupe 1 : mélange quaternaire (2,5 mg/kg aa)

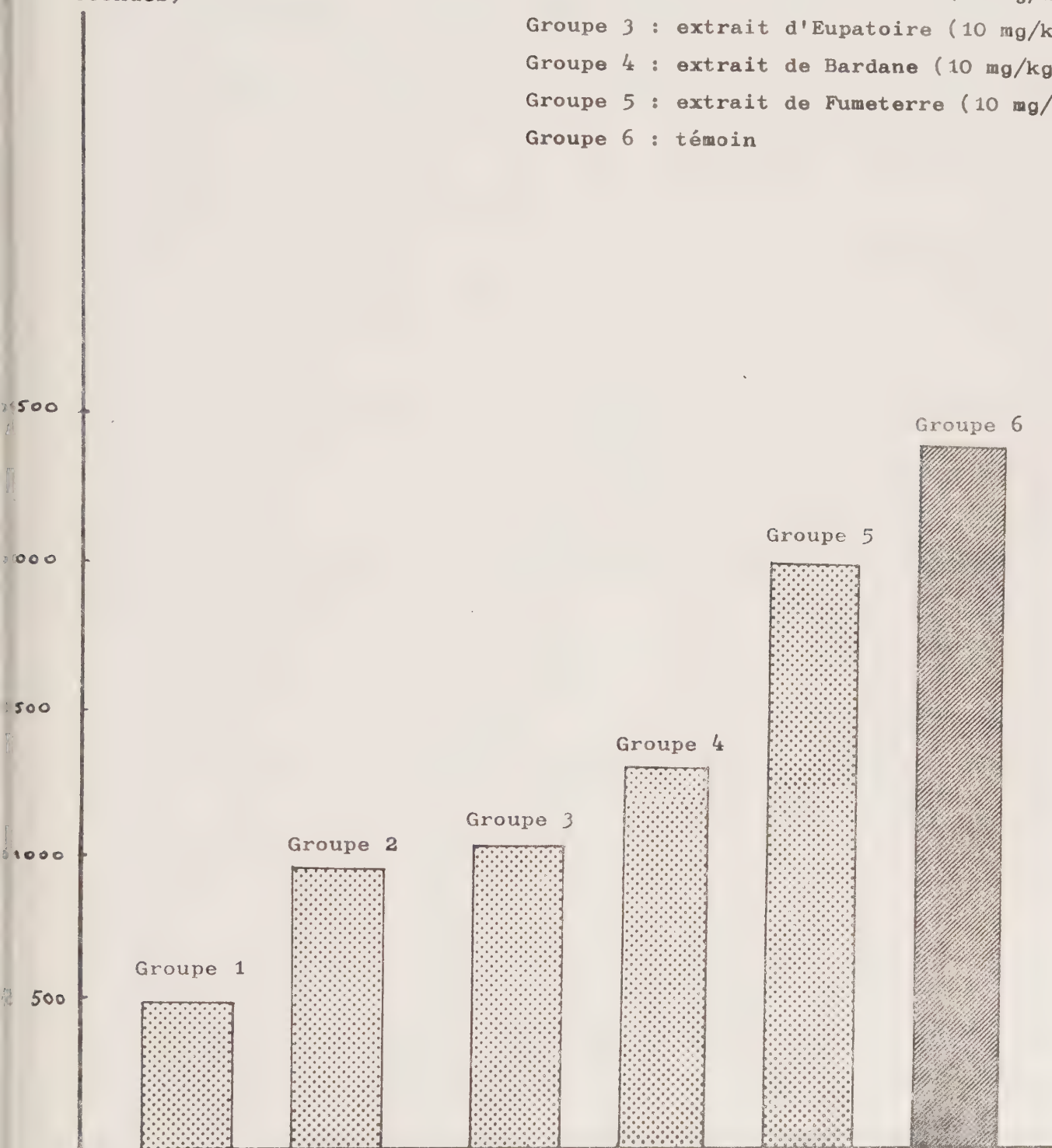
Groupe 2 : extrait d'Artichaut (10 mg/kg)

Groupe 3 : extrait d'Eupatoire (10 mg/kg)

Groupe 4 : extrait de Bardane (10 mg/kg)

Groupe 5 : extrait de Fumeterre (10 mg/kg)

Groupe 6 : témoin



Le bloc acide, étant ainsi amputé de la moitié de ses constituants les plus actifs, on conçoit la faible activité de l'extrait de Fumeterre.

Par contre, les extraits de Bardane et plus encore d'Eupatoire s'avèrent très actifs, ce qui est en parfait accord avec les résultats analytiques obtenus. En effet, ces extraits contiennent, l'un comme l'autre, les 3 acides : malique, citrique, et succinique, ainsi que les homologues proches de l'H.M.A.. Ceci nous incline à penser, une fois encore, que les dérivés de l'acide acrylique jouent un rôle semblable à celui de l'H.M.A. dans l'Artichaut.

II - VARIATION DE LA D L 50 DE L'ALCOOL ETHYLIQUE CHEZ LA SOURIS

1) - Protocole expérimental

La D L 50 a été déterminée par voie intrapéritonéale selon la méthode de REED et HUENCH, décrite précédemment. Ainsi 9 lots d'animaux reçoivent en intrapéritonéale 10 mg/kg des extraits butanoliques à étudier puis, 20 minutes après, une nouvelle injection d'alcool à dose croissante est pratiquée. Les animaux sont surveillés pendant 8 jours. Les morts sont alors comptés et la détermination de la D L 50 sera établie suivant la technique précédente.

2) - Résultats et discussion

Les résultats sont consignés dans le tableau T 29 et ces valeurs sont comparées à celles obtenues après injection d'extrait d'Artichaut et du mélange quaternaire. On remarque là encore que, si les extraits butanoliques des 3 Composées ont un effet détoxiquant vis-à-vis de l'alcool, les extraits de Fumeterre sont pratiquement inactifs ; nouvelle confirmation des observations précédentes. En effet, seul le mélange quater-

TAB. (T29) : VARIATIONS DE LA D L 50 DE L'ALCOOL ETHYLIQUE

APRES INJECTION D'EXTRAIT BUTANOLIQUE DE DIVERSES DROGUES :

COMPARAISON AVEC L'EXTRAIT D'ARTICHAUT ET L'ASSOCIATION QUATERNAIRE

EXTRAITS ET ASSOCIATION	D L 50 (EN g/l)	% D'AUGMENTATION DE LA D L 50
Association quaternaire acides malique, citrique, succinique et H.M.A. (2,5 mg/kg aa))	7,2	50 %
Artichaut (10 mg/kg)	6,8	21 %
Epatoire (10 mg/kg)	6,6	18 %
Erdane (10 mg/kg)	6,4	14 %
ometerre (10 mg/kg)	5,8	3,5 %
omoin alcool	5,6	-

naire dont la constitution chimique est superposable à celle des extraits d'Artichaut, d'Eupatoire et de Bardane est véritablement actif. Ce n'est pas le cas de l'extrait de Fumeterre, dont le bloc acide est amputé de 2 de ses constituants et pour lequel l'activité détoxicante est presque nulle.

Les résultats obtenus sur la détoxication de l'alcool sont donc parfaitement comparables à ceux obtenus avec le pentobarbital.

III - EFFETS AMPHOCHOLERETIQUES DE DIVERS EXTRAITS BUTANOLIQUES

Comme précédemment, nous avons sélectionné quatre espèces parmi les sept drogues examinées afin de préciser leur éventuelle activité amphotocholérétique et de la comparer à celle induite par l'extrait d'Artichaut. Nous avons aussi étudié les extraits butanoliques obtenus à partir des racines de Bardane, des feuilles d'Eupatoire, de Boldo et de Fumeterre.

1) - Protocole expérimental

Nous appliquons à ces drogues la méthode utilisée et décrite pour l'Artichaut. Après réalisation d'une fistule biliaire sur le rat, le débit de base est noté ; puis l'hypercholérèse est provoquée par injection intraveineuse de D.H.C. à raison de 10 mg/kg. Lorsque la cholérèse de base est à nouveau rétablie, on injecte simultanément au même animal la solution de déhydrocholate de sodium (D.H.C.) (10 mg/kg) et l'extrait butanolique salifié (40 mg/kg). Les variations du débit biliaire sont alors notées et comparées à celles induites par le D.H.C. seul.

L'hypochocholérèse a été réalisée, comme précédemment, à l'aide d'une solution d'azide de sodium, administrée à raison de 1 mg/kg, par voie intraveineuse. L'expérimentation a porté sur cinq lots d'animaux : un premier lot reçoit l'azide de sodium seul et les quatre autres lots reçoivent respectivement les divers extraits butanoliques salifiés dix minutes avant l'injection d'azide de sodium. Afin de vérifier si les extraits, obtenus à partir des diverses drogues, n'entraînent aucune variation du débit biliaire physiologiquement normal, ces cinq lots d'animaux sont comparés à cinq lots témoins ayant reçu l'un une solution de chlorure de sodium isotonique et les quatre autres une solution salifiée des extraits étudiés.

2) - Résultats et discussion

Les pourcentages d'augmentation de la cholérèse, après injection simultanée de D.H.C. et des extraits butanoliques sont comparés à une augmentation de 100 %, valeur attribuée forfaitement à l'hypercholérèse induite par l'injection de 10 mg/kg de D.H.C. seul. L'hypercholérèse est exprimée en pourcentage de diminution du débit biliaire observée pendant les trente premières minutes qui suivent les injections. L'ensemble de ces résultats, comparés à ceux obtenus pour l'extrait d'Artichaut sont résumés dans le tableau T 30, dans lequel, pour souci de clarté, nous n'avons inscrit que les valeurs obtenues pour les diverses drogues vis-à-vis du D.H.C. et de l'azide de sodium, sans y faire figurer celles des lots témoins.

A la lecture de ce tableau on remarque, là encore, que les extraits des trois Composées ont un effet aphocholérétique, ce qui ne saurait nous surprendre, car la constitution

TAB. (T30) : ETUDE COMPARATIVE DE L'AMPHOCHOLERESE

INDUITE PAR LES EXTRAITS BUTANOLIQUES DE DIVERSES DROGUES

EXTRAITS ETUDIES	HYPERCHOLERESE PROVOQUEE (% d'augmentation de la cholérèse)	HYPOCHOLERESE PROVOQUEE (% de diminution de la cholérèse)
D.H.C.	100	
Azide de sodium		- 27
Artichaut	50	- 9
Eupatoire	60	- 11
Bardane	65	- 13
Boldo	70	- 15
Fumeterre	90	- 20

de leur ~~bloc~~ acide est très semblable à l'association quaternaire constituée par les acides succinique, citrique, malique et H.M.A. (10 mg/kg ^â), pour laquelle nous avons constaté une activité amphocholérétique.

Les valeurs plus modestes obtenues pour le Boldo sont en parfait accord avec les résultats analytiques. Le Boldo contient en effet trois des acides du mélange quaternaire : seul H.M.A. fait défaut, mais le nombre total d'acides présents dans cette drogue est élevé (7 au total), et compense peut-être en partie ce déficit.

Le Fumeterre qui ne contient ni H.M.A. ni acide succinique a des propriétés amphocholérétiques encore moins marquées. Ceci est d'autant plus curieux que les effets amphocholérétiques ont été mis en évidence et décrits pour la première fois (BOUCARD) sur le nébulisat de Fumeterre.

Cette constatation peut s'expliquer par le fait que les extraits de Fumeterre contiennent peut-être d'autres principes potentialisés par les acides et acides-alcools présents même en faible quantité, renforçant l'effet amphocholérétique des acides.

Cette hypothèse est en effet à rapprocher des expérimentations faites sur la Cynarine, principe cholérétique et diurétique de l'Artichaut. En effet, ayant constaté l'activité amphocholérétique de l'extrait d'Artichaut, nous avons pensé que l'hyper-cholérèse induite par la Cynarine serait, en toute logique, diminuée par cet extrait acide. Or, contrairement à toute attente, l'effet observé est l'inverse. L'augmentation de la cholérèse induite par injection simultanée de la Cynarine et de l'extrait butanolique d'Artichaut est plus importante que

lors de l'injection de Cynarine seule et de plus sa durée d'action est largement augmentée. Une constatation semblable a pu être observée sur la diurèse. On sait que cette dernière induite par l'association quaternaire constituée par les acides malique, citrique, succinique et H.M.A. (10 mg/kg ^â) est très importante, mais sa durée d'action est augmentée si cette injection est réalisée simultanément avec la Cynarine, alors que ce principe actif injecté seul ne provoque qu'une diurèse très légère. Nous nous trouvons donc bien en face d'un effet de synergie important et c'est là encore un des aspects de ces composés acides aliphatiques qui semblent potentialiser certains principes actifs naturels.

C O N C L U S I O N S

Notre objectif, en entreprenant ce travail, avait été d'essayer de mettre en évidence les principes actifs susceptibles d'apporter quelques éclaircissements sur les activités cholagogues, cholérétiques et diurétiques d'un certain nombre d'espèces végétales traditionnellement utilisées à cet effet en médecine populaire.

Ces réputations thérapeutiques, définies plus ou moins confusément, ont cependant résistées à l'épreuve du temps, et sont encore de nos jours utilisées empiriquement.

Il paraissait donc raisonnable de chercher à isoler tout d'abord certains composés particuliers présents dans les plantes, puis de définir, de façon plus précise, les diverses activités pharmacodynamiques précitées.

Nous ne nous engageons pas dans un terrain totalement inexploré, car certains laboratoires pharmaceutiques avaient utilisé ces données pour fournir à l'arsenal thérapeutique quelques spécialités dont l'utilisation confirmait une efficacité en clinique humaine : extraits d'Artichaut ou de Fumeterre par exemple.

En fait, si l'Artichaut nous a permis d'engager ces travaux préliminaires, nous le devons à l'idée princeps de Georges EDGARD-ROSA (1935), qui avait pratiqué sur cette COMPOSEE une hydrolyse alcaline, procédé brutal et pour le moins inhabituel en phytochimie. Cette technique permettait à cet auteur d'obtenir un "extrait purifié d'Artichaut" facilement administrable par voie parentérale.

Monsieur le Professeur JOUANY, nous orienta vers l'étude du bloc complexe des acides et acides-alcools présents

dans cet extrait sur lequel Monsieur le Professeur JONDET réussit à obtenir des résultats pharmacodynamiques précis au stade de l'expérimentation animale.

Tous ces faits prirent une nouvelle signification lorsque nous entreprimes le relevé des drogues utilisées dans les Pharmacopées traditionnelles, en dressant un tableau comparatif de leur composition chimique.

En fait, notre attention fut attirée par la présence notable d'acides organiques et d'acides-alcools, fait qui trouvait sa justification dans les travaux de BALANSARD, auteur qui attribuait également les propriétés hépatorénales de certaines plantes à leur richesse en acides glycérique et glycolique.

Toutefois, parmi les plantes à réputation hépatorénale, l'Artichaut est de loin l'espèce la plus utilisée, comme un récent travail, au laboratoire de Monsieur le Professeur PELT, l'a montré (LAURENT, 1969).

Toutes ces raisons ont fait que notre étude a été entreprise à partir de l'Artichaut : Cynara scolymus, L.

Ainsi les extraits purifiés de Cynara scolymus, L., furent notre matériel d'étude initial. Ces derniers, ne contenant plus de CYNARINE, considérée comme le principe actif cholérétique et diurétique, manifestaient néanmoins une activité pharmacodynamique importante (MICHAUD, 1964). Il était alors possible d'envisager les éventuels acides organiques comme les supports principaux de l'activité pharmacologique de ces préparations.

Dans la première partie de notre travail, nous avons donc tenté de mettre au point des méthodes d'extraction simples et complètes, des techniques de séparation, de caractérisation puis d'identification et enfin de dosage des acides organiques aliphatiques, en particulier de certains acides-alcools présents dans l'Artichaut.

La méthode d'extraction qui s'est le mieux adaptée à ce problème a fait appel au méthanol acide, technique d'extraction sans hydrolyse préalable évitant ainsi tout artefact de préparation.

Cependant, les hydrolyses préalables en milieu acide n'ont pas été sans intérêt, car elles nous ont permis de mettre en évidence la présence d'un acide original, bien que déjà connu des organiciens, l'acide α -hydroxyméthylacrylique. Ce corps organique provient en particulier de la dégradation du principe amer contenu dans la plante : la CYNAROPICRINE. L'extraction méthanolique, a permis également de retrouver cet acide original en proportion non négligeable et probablement à l'état libre.

Certaines réactions colorées traditionnelles des acides organiques et acides-alcools, le plus souvent empruntées à DENIGES, purent nous donner certaines indications sur la nature chimique de ces Composées. Cependant, les premières caractérisations précises nous furent fournies par la C.C.M., faisant appel à plusieurs types de solvants : soit un solvant acide (toluène - formiate d'éthyle - acide formique (50-40-10 V/V)), soit un solvant alcalin (éthanol - chloroforme - ammoniacque à 25 % (68-15-17 V/V)).

Après avoir adapté, à la révélation sur plaque de silica-gel, une série de réactions colorées, décrites *in vitro*, nous avons pu établir une grille à deux entrées suivant le type de solvant et de Rf ou suivant le type de révélation.

Ceci permettait une identification assez rapide des composés présents dans le mélange d'acides obtenu après extraction du matériel végétal par le méthanol acide.

Ainsi les acides suivants ont donc été retenus ou tout au moins soupçonnés : acides glycérique, glycolique, lactique, citrique, malique, succinique et α -hydroxyméthylacrylique.

La C.C.M. ne pouvait évidemment apporter une sécurité suffisante et l'appréciation quantitative restait délicate. Nous avons alors appliqué les techniques de G.L.C., au mélange d'acide tel quel ou après certains traitements préalables. Cependant nous avons remarqué qu'à température élevée, la tension de vapeur des acides concernés est généralement insuffisante pour permettre une chromatographie correcte.

Nous avons donc estérifié ces composés par formation des dérivés triméthylsilylés correspondants. Si, grâce à leur temps de rétention, la caractérisation de ces acides est aisée, il n'en est pas toujours de même pour d'autres composés. Le dosage, grâce à l'emploi de surcharges, d'étalons internes, et par comparaison à des gammes étalons, est impossible. Aussi, afin d'obtenir davantage de garanties, nous avons fait appel aux dosages enzymatiques, jusqu'alors rarement utilisés en phytochimie de routine et qui nous ont permis de doser très correctement les acides malique, citrique et lactique. Cependant deux difficultés se sont alors présentées. Tout d'abord le dosage de l'H.M.A. par voie enzymatique était impossible,

en raison de l'absence même d'enzyme spécifique. La présence d'une enzyme spécifique de ce composé organique devrait être recherchée dans les plantes contenant l'H.M.A. et nous nous proposons, par la suite, d'aborder ce problème fondamental.

De même, le dosage de l'acide succinique par la succinyldehydrogénase n'a pas été couronné de succès, ce qui est en accord avec les constatations faites par BOGAERT. Cette enzyme serait inhibée par certains composants du bloc acide de l'Artichaut et probablement par l'H.M.A..

De ce fait, nous avons adopté pour le dosage des acides malique, citrique et lactique la méthode enzymatique, réservant les techniques de G.L.C. à la détermination quantitative des acides H.M.A. et succinique, avec toutes les réserves apportées à cette méthode.

Ces problèmes analytiques, une fois résolus, il nous sera alors possible d'établir des comparaisons à la fois qualitative et quantitative entre les diverses plantes à réputation hépatorénale et l'Artichaut.

De plus, il fallait savoir si les acides organiques ainsi décrits pouvaient être le support d'activités pharmacodynamiques connues ou non. Cette étude fit l'objet de la deuxième partie de notre travail.

Après avoir étudié les toxicités aiguës et à court terme de l'extrait acide d'Artichaut, nous avons ainsi déterminé la D L 50 de ce dernier par voie parentérale chez le rat ; cette dose est de 800 mg/kg. Ce mélange complexe d'acides présent dans l'extrait semble en effet doué d'une toxicité réduite, ce dont on pouvait déjà se douter d'après les expériences cliniques fréquemment rapportées dans la littérature.

Puis, afin de préciser les potentialités thérapeutiques de ces extraits et des acides, il fallait fixer son choix sur des tests pharmacologiques se rapportant aux indications thérapeutiques et cliniques. Des tests simples devaient être mis en oeuvre afin de permettre, d'une part une étude systématique des acides organiques pris isolément ou en association, et d'autre part une comparaison aisée entre divers extraits obtenus à partir d'espèces botaniques réputées pour leur activité hépatorénale ou non.

Nous avons ainsi mis en évidence l'action diurétique de ces extraits acides en provoquant la diurèse forcée chez le rat et le lapin, et tenté d'apprécier le travail de concentration et de filtration rénale sur le plan ionique.

L'activité hépatique a été testée en appréciant chez le rat l'effet amphocholérétique (BOUCARD, 1966) induit par ces extraits. Nous avons également déterminé les quantités et les formes de la bilirubine et du cholestérol ainsi secrétées.

Nous avons également apprécié l'activité détoxicante de ces extraits en étudiant leurs effets protecteurs vis-à-vis de l'intoxication alcoolique aiguë et leurs effets antagonisants vis-à-vis de la narcose induite par le PENTOBARBITAL.

Les diurèses forcées chez le lapin placé sous perfusion constante de soluté de NaCl isotonique, nous ont montré, sur le simple aspect du volume d'urine émise, que les acides glycerique et glycolique utilisés seuls ou associés, étaient doués d'une certaine activité diurétique, comme l'avait souligné BALANSARD.

Si cette activité se retrouve lors des injections d'H.M.A., il faut constater que les acides malique, citrique et succinique pris isolément sont inactifs ; leur association révèle déjà une nette activité diurétique qui est potentialisée par l'H.M.A. dont la présence est déterminante.

Ainsi, le mélange qui possède de très loin l'activité la plus grande, est l'association que nous avons qualifiée de quaternaire réunissant les acides malique, citrique, succinique et H.M.A. à la dose de 10 mg/kg aâ.

En effet, ce mélange provoque une diurèse abondante durable et perturbe assez peu la concentration ionique de l'urine, nous permettant ainsi de qualifier cette activité de "diurèse physiologique". Il n'y a pas en effet de discrimination ou de concentration particulière d'un ion, ni de diurèse aqueuse comme il est fréquent de le rencontrer avec les diurétiques mercuriels ou sulfamidés dont cet effet présente un danger en thérapeutique.

Nous avons poursuivi l'étude de l'action de ce mélange quaternaire et des extraits d'Artichaut en vue de mettre en évidence une éventuelle activité hépatique et notamment un effet amphocholérétique.

L'action amphocholérétique la plus nette (antagonisme vis-à-vis du dycholium : hypercholérétique, et de l'azide de sodium : hypocholérétique) a de nouveau été obtenue pour le mélange quaternaire et l'extrait d'Artichaut. Dans ce cas encore nous avons pu remarquer la part déterminante de l'H.M.A. dans cette association quaternaire, les acides malique, succinique et

citrique en mélange ne possédant qu'une activité discrète.

Quant aux modifications de la qualité de la bile recueillie au cours de ces expérimentations, on constate une tendance extrêmement nette à l'augmentation du cholestérol estérifié, ce qui correspond effectivement au point d'impact des différentes préparations d'Artichaut, fait signalé depuis longtemps dans la littérature.

A la suite des résultats obtenus par JONDET, sur la qualité de la narcose induite par le PENTOBARBITAL chez la souris après protection par l'extrait purifié de Cynara scolymus, L., nous avons, suivant cette technique, comparé les effets de ce même extrait, employé comme témoin, à ceux induits par les extraits butanoliques d'Artichaut et le mélange quaternaire d'acide. Ainsi nous avons pu constater des diminutions très nettes de la durée de narcose, de plus ces diminutions du temps de sommeil sont très voisines ce qui nous permettait de penser que les acides du mélange quaternaire étaient bien les responsables de cette activité. Les doses optimum se situent alors aux environs de 2,5 mg/kg $\hat{a}\hat{a}$, ce qui représente une activité remarquable pouvant justifier l'emploi du terme de "principe actif". Rappelons que la D L 50 des acides constituant le mélange quaternaire est de 1 g/kg, ce qui correspond aux chiffres obtenus pour l'extrait d'Artichaut ; ceci nous permet d'apprécier le coefficient thérapeutique extrêmement favorable de ces "principes actifs".

Dans cet esprit nous avons recherché^{si} des doses identiques aux précédentes avaient un effet protecteur vis-à-vis de l'intoxication aigüe provoquée par l'éthanol. Dans ces conditions l'extrait purifié de Cynara scolymus, L., l'extrait butanolique

d'Artichaut et le mélange quaternaire, apportent une protection importante, et la D L 50 de l'éthanol, administré par voie intrapéritonéale, passe de 5,2 g à 7,2 g/kg.

Toutes ces investigations chimiques et pharmacodynamiques nous permirent de faire les constatations suivantes:

Il existe dans l'Artichaut des composés de caractère acide méritant la dénomination de "principes actifs", pouvant justifier en partie du moins, certaines réputations thérapeutiques tant sur les plans diurétique, hépatique ou détoxiquant qui lui sont généralement reconnues.

Le composé le plus important est, sans conteste, l'acide α -hydroxyméthylacrylique, dont les potentialités sont exacerbées par la présence des acides malique, citrique et succinique.

Cependant deux questions restaient à éclaircir : étions-nous certains d'être en présence de l'H.M.A. et dans l'affirmative, sous quelle forme existait-il dans la plante ?

Nous pûmes rapidement répondre par l'affirmative à la première question. En effet nous avons pu, grâce à l'obligeance de Monsieur le Professeur MOSKOWITZ, qui a mis à notre disposition un acide α -hydroxyméthylacrylique pur obtenu par synthèse, établir la comparaison du composé synthétique et du composé retiré de la plante. Ainsi, grâce à leurs critères physico-chimiques, nous avons pu constater une similitude complète entre ces deux corps organiques et de ce fait conclure à la présence effective de cet acide original dans nos extraits.

Il s'agissait, enfin, de savoir sous quelle forme cet acide existait dans la plante. On sait que l'H.M.A. est un constituant de la CYNAROPICRINE. Il était possible que les hydrolyses

préalables, aient pu séparer cet acide du principe amer, dont la présence dans l'Artichaut avait déjà attiré notre attention. Or après extraction, par un mélange peu polaire constitué en majeure partie par du Chlorure de méthylène, nous avons pu retirer et mettre en évidence l'H.M.A., dont la présence ne pouvait être attribuée à quelque hydrolyse. Il nous paraissait alors possible de prétendre que cet acide existe bien à l'état libre.

Dans le cadre de ce travail il n'a malheureusement pas été possible de quantifier la présence de cet acide α -hydroxyméthylacrylique à l'état libre et combiné ; il aurait fallu, pour ce faire, avoir une idée précise de ces teneurs qui, certainement, varient suivant les parties de la plante et le rythme saisonnier. Ces points seraient à vérifier ultérieurement.

Si nous avons pu résoudre ainsi certains problèmes analytiques, il fallait essayer d'interpréter le mécanisme d'action de ces acides et des extraits butanoliques d'Artichaut que nous avons mis en évidence à travers les effets pharmacologiques précédents.

Il faut tout d'abord remarquer la faible toxicité de certains de ces composés acides, qui sont des produits du métabolisme intermédiaire des cellules végétales et animales. Ainsi, les acides citrique, succinique et malique sont, dans cet ordre, inclus dans le cycle végétal de KREBS.

Dans un autre domaine, l'H.M.A., synthétisé par les plantes peut également se retrouver au niveau des synthèses de l'acide mévalonique, carrefour important des voies métaboliques des lipides, des principes amers et des essences.

D'autre part ce bloc acide antagonise un inhibiteur

métabolique tel que l'azide de sodium. Tous ces faits nous poussent à chercher des arguments métaboliques pour tenter d'expliquer ces activités.

On peut envisager a priori ces explications sous trois formes.

Ces composés peuvent agir comme des substrats, et l'on ne peut s'empêcher de rapprocher l'action antagoniste vis-à-vis du PENTOBARBITAL, de la présence d'acide succinique déjà employé en thérapeutique à cet effet. La contribution des autres acides est dans ce cas, moins nette, mais peut aussi trouver une explication : l'acide citrique est le précurseur de l'acide succinique et l'acide malique est un fournisseur direct de la chaîne respiratoire cellulaire génératrice d'A.T.P..

Ces acides peuvent également interférer sur l'équilibre d'oxydo-réduction cellulaire par le biais des coenzymes NAD et NADP comme JOUANY l'avait signalé, fait qui peut trouver sa confirmation dans l'action antagoniste de ces acides vis-à-vis de l'éthanol dont le devenir métabolique emprunte ces voies.

Ces composés acides peuvent également interférer directement au niveau de l'enzyme, comme il semble que ce soit le cas de l'H.M.A., doué d'activité anti-succinyldehydrogénase. Ainsi, dans ce mélange d'acides, il faut remarquer que chaque composé a son importance, l'H.M.A. semble indispensable, et représente en quelque sorte, la clé de voute du système.

Cependant il nous paraît difficile de rapporter toute l'activité pharmacodynamique de l'Artichaut à la présence de ces seuls acides, car il faut tenir compte des ions et notamment du K^+ , des flavonoïdes, de la CYNARINE et de la CYNAROPICRINE dont

les propriétés diurétiques sont connues. Cependant l'association de tous ces composés dans la plante entière peut être potentialisée par le complexe d'acides et d'acides-alcools mis en évidence.

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons utilisé les techniques analytiques et les méthodes pharmacologiques citées précédemment. Ainsi nous avons pu comparer un certain nombre de plantes à l'Artichaut. Notre choix s'est porté sur des espèces dont les réputations étaient identiques à celles de l'Artichaut ou de la même famille. Nous avons enfin utilisé certaines espèces dénuées de réputation et qui tinrent alors lieu de témoin négatif.

Dans le grand nombre de plantes qui jouissaient de réputation hépatorénale, nous en avons sélectionné 7 : les racines de Bardane et les feuilles d'Eupatoire, plantes appartenant à la famille des COMPOSEES et qui contiennent des homologues de l'H.M.A. ; le Fumeterre pour ses propriétés amphotcholérétiques décrites par BOUCARD ; la Piloselle connue pour ses propriétés diurétiques ; les styles de Maïs pour leur richesse en acides organiques , L'Orthosiphon nous apparut également une plante intéressante car elle possédait des propriétés hépatorénales suffisantes pour que cette espèce apparaisse à la dernière édition de la Pharmacopée Française. Enfin le Boldo fut également retenu car réputé depuis longtemps pour son action sur le foie.

Dans cet "échantillon", les divers acides ont été caractérisés, dosés et testés dans chaque espèce. Les résultats ont pu ainsi être comparés à ceux obtenus pour l'Artichaut. Ainsi la Bardane et l'Eupatoire se sont avérées les plus actives, ce

fait est sans doute à rapprocher de la présence dans ces COMPOSEES des homologues de l'H.M.A. qui semblent posséder les mêmes potentialités thérapeutiques.

Quant aux extraits acides des autres drogues, l'intensité de leur réponse pharmacodynamique a été parallèle à leur composition chimique. C'est ainsi que l'extrait acide de Piloselle, le plus pauvre en acides-alcools, s'est aussi révélé le moins actif.

Dans un autre ordre d'idée, nous avons pu également mettre en évidence les effets de potentialisation du mélange d'acides et d'acides-alcools vis-à-vis de l'activité cholérétique de la CYNARINE. Bien que ces résultats n'aient pas été publiés dans notre travail en raison d'une expérimentation trop réduite, nous avons pu néanmoins constater une très nette augmentation de la cholérèse si on a eu la précaution d'injecter, 20 minutes avant la Cynarine, 40 mg/kg du mélange quaternaire. Ce fait est peut-être à rapprocher de la présence de ces acides et acides-alcools dans les squames de bulbe de Scille, et il n'est pas interdit de penser que ces composés organiques renforcent l'action diurétique des hétérosides cardiotoniques de cette plante. Cette éventuelle potentialisation explique peut-être les effets observés sur l'extrait total de Scille, qui s'est révélé plus actif que le scillarène lui-même.

Les résultats nous ont donc permis de préciser l'idée princeps exprimée au début de ce travail. Le bloc acide des plantes peut justifier sinon expliquer certaines de leurs activités hépatorénales. Les dérivés hydroxyacryliques, esters des guaïanolides constituant les principes amers, apportent

une efficacité déterminante et rejoignent ainsi la réputation attribuée aux principes amers de l'Artichaut.

Ces résultats attirent d'autre part notre attention sur les phénomènes de synergie et de potentialisation, dont il est si fréquemment question dans le langage des pharmacognosistes et qui trouvent ici une démonstration particulièrement spectaculaire.

Ainsi se trouve justifié une fois de plus l'intérêt propre et spécifique des extraits phytothérapiques qui produisent des effets thérapeutiques différents et beaucoup plus complexes que les principes actifs "dominants" qu'ils contiennent.

Nos résultats ne nous permettent donc pas de déterminer comparativement la valeur thérapeutique des drogues étudiées par simple extrapolation de leur teneur en acides ou acides-alcools. Car dans la plupart de ces drogues, d'autres principes interviennent qui contribuent à l'effet thérapeutique : c'est notamment le cas de la CYNARINE pour l'Artichaut, de la BOLDINE et de l'Huile essentielle pour le Boldo.

Enfin, le rôle des acides ou acides-alcools présents dans les plantes étudiées, met une fois de plus en évidence l'intérêt thérapeutique majeur de molécules simples et naturelles. Dans un travail récent visant à préciser la place des molécules naturelles en thérapeutique, J.M. PELT et J. LAURE concluaient ainsi : "Significative est l'orientation de la thérapeutique vers les "petites molécules de la vie", s'intégrant dans les métabolismes élémentaires et restaurant leur équilibre!"

A côté des molécules complexes sans analogie avec les structures vivantes et au mode d'action souvent inconnu, viennent prendre place, en nombre toujours plus grand, des molécules simples au comportement prévisible". Les acides et acides-alcools du métabolisme cellulaire (cycle de KREBS, glycolyse anaérobie etc...) appartiennent bien à ce type de molécule, aux effets d'autant plus favorables que, dans notre cas, leur toxicité est pratiquement nulle.

Le fait de les avoir trouvés presque systématiquement, et en proportions importantes, dans des drogues réputées depuis des siècles pour leurs effets hépatorénaux, montre enfin l'intérêt des recherches visant à l'exploration des ressources des Pharmacopées traditionnelles, en vue de la rationalisation de l'usage des drogues qu'elles contiennent. Le long usage thérapeutique de ces drogues est le fruit d'une sorte de "screaming naturel" effectué au cours des siècles et il est logique de penser que certaines des plantes utilisées correspondent effectivement aux indications pour lesquelles elles ont été sélectionnées par les apothicaires d'autrefois.

Notre travail s'inscrivait donc bien dans la ligne des recherches effectuées au laboratoire de biologie végétale. Depuis plusieurs années, il a bénéficié d'une Direction pluridisciplinaire des professeurs JOUANY et PELT, dont les directives et les conseils nous ont permis d'explorer ces voies de recherches grâce à des points de vue et des méthodes souvent fort différentes. A ce groupe pluridisciplinaire étaient d'ailleurs associés Monsieur le Professeur DELAVEAU ainsi que mon camarade

BOGAERT, dont les recherches menées en étroite collaboration avec les nôtres se sont développées dans des voies parallèles, visant plus particulièrement à préciser le rôle des principes amers de la CYNAROPICRINE et de l'H.M.A..

Certes, le problème est loin d'être épuisé : il conviendrait d'envisager les possibilités d'accumulations spécifiques à certains groupes taxinomiques (taxinomie chimique des acides-alcools), de rechercher dans la famille des COMPOSEES, d'autres espèces à propriétés similaires, ou d'autres plantes possédant l'acide hydroxyméthylacrylique ou l'un de ses homologues ou dérivés. Ces recherches ^{sont} d'ores et déjà en cours au sein du groupe pluridisciplinaire auquel nous appartenons et auquel nous devons d'avoir pu effectuer ce travail.

B I B L I O G R A P H I E

AMATUS LUSITANUS, 1551.-

In Curationum medicinalium centuriae septem. Ed.
Torrentinus. Florence.

ARNOW E.L., 1937.-

Colorimetric determination of the components of
3,4 - dihydroxyphénylalanine - thyrosine mixtures.
J. Biol. Chem., 118, 531-537.

ATHERINOS A.E., EL-KOLY EL-SAYED I., SOLIMAN G., 1962.-

Chemical Investigation of CYNARA scolymus, L. Part 1°. The steroids of the Receptacles and Leaves. J. Chem. Soc., London, 20, 1700-1704.

BALANSARD J., 1951.-

Mise en évidence de l'acide glycolique chez diverses drogues utilisées comme diurétiques. Médecine tropicale, n° 4, 638-639.

BALANSARD J., 1952.-

Les principes actifs diurétiques hépatorénaux : Acides glycolique et glycérique. Produits pharmaceutiques, 7, 456-458.

BALANSARD J., DELPHAUT J., ARNOUT M., BERNARD P. et GREBUS Ch., 1951.-

Contribution à l'étude des diurétiques hépatorénaux. Médecine tropicale, 4, 622., 6, 869.

BALANSARD J. et BERNARD P., 1952.-

Recherches des acides organiques fixes dans quelques drogues végétales. Bull. Soc. Pharm., Marseille, 2, 28-32.

BERNARD P. et LALLEMAND A., 1953.-

La feuille d'Artichaut, *Cynara scolymus* L.. Etude chimique et pharmacodynamique. Bull. Soc. Pharm., Marseille, t I, 15-22.

BEROZA M., 1963.-

Agri. and Food Chemistry, 11, 51.

BOGAERT J.P., MORTIER F., DELAVEAU P., JOUANY J.M. et PELT J.M., 1972.-

Intérêt des déterminations par voie enzymatique de certains acides-alcools dans les drogues végétales. Bull. Soc. Pharm., Nancy, 94, 11-16.

BOGAERT J.P., MORTIER F., JOUANY J.M., PELT J.M. et DELAVEAU P., 1972.-

Acides organiques, en particulier acides-alcools du *Cynara scolymus* L. (Composées). Annal. Pharm. Fran., 30, 401-408.

BOUCARD M. et LAUBENHEIMER B., 1966.-

Action du nébulisat de Fumeterre sur le débit biliaire du rat. Thérapie, 21, 903-911.

BREL J., 1930.-

L'Artichaut. Ed. Amédée Legrand, Paris.

BRUNNEL A., 1952.-

Traité pratique de chimie végétale, 4, 190.

CHABROL E., CHARONNAT R., MAXIMIN M., WAITZ R., 1931.-

L'action cholérétique des Composées. C.r. Soc. Biol. Fr., 108, 1020-1022.

CHABROL E., CHARONNAT R., MAXIMIN M., WAITZ R. et POIRIN J., 1931.-

L'action cholérétique des COMPOSEES. C.r. Soc. Biol. Fran., 108, 1100-1102.

- CHABROL E., CHARONNAT R., MAXIMIN M. et BUSSON A., 1932.-
L'action cholérétique des Labiées. C.r. Soc. Biol.
Fran., 109, 275-276.
- CHOMEL P.H.B., 1761.-
In "Abrégé de l'histoire usuelle des plantes". Paris,
(cité par ROCHIETTA).
- DENIGES G., CHELLE L. et LABAT A., 1930.-
Précis de chimie analytique. Ed. Maloine, Paris,
236-238.
- DOLEJS L., HEROUT V., 1962.-
Constitution of Eupatoriopicrin, a germacranolide
from Eupatorium cannabinum L. Coll. Czechoslov.
Chem. Commun., 27, 2654-2661.
- DUTEUIL J., NADAUD J. et PESSONIER J., 1968.-
Interaction entre le nébulisat de tilleul et le dé-
hydrocholate de sodium sur la cholérèse du rat. Thé-
rapie, 23, 427-431.
- EDGARD-ROSA G., 1934.-
D'un principe actif du Cynara scolymus L., Gaz. Hôp.,
n° 21, 373-374.
- FOURNIER, 1952.-
Les plantes médicinales. Ed. Paul le Chevalier, Paris.
- GARNIER F., BEZANGER-BEAUQUESNE L., DEBRAUX G., 1961.-
Ressources médicinales de la flore française, t I et
II, Ed. Vigot frères, Paris.
- GARROS M., 1934.-
Les cholagogues. Thèse Doct. Univ. Pharm., Toulouse.
- GUITEAU P., 1935.-
Rev. Méd. Fran., 16, 401 (cité par TIXIER L.).

GRIGNARD V., 1945.-

Traité de chimie organique, 11, fasc. 1, Ed. Masson, Paris, 371.

HEGNAUER R., 1962 à 1969.-

Chemotaxinomie der Pflanzen. Ed. Birkhauser Verlag Basel und Stuttgart, t I à V.

HOHORST H.J., 1963.-

L. (+) - Lactate determination with lactic dehydrogenase and D.P.N.. In BERGMAYER H.U. : Methods of enzymatic analysis, Academic Press. Ed., New-York and London, 266-270.

HOHORST H.J., 1963.-

L. (-) - Malate determination with malic dehydrogenase and D.P.N.. In BERGMAYER H.U. : Methods of enzymatic analysis, Academic Press. Ed., New-York and London, 328-332.

HUMMEL J.P., 1949.-

The Fluorometric determination of malic acid. J. Biol. Chem., 180, 1225-1228.

JOUANY J.M., 1965.-

Action de l'extrait purifié de *Cynara scolymus* L., sur les taux de Nicotinamide adénine dinucléotide dans le foie de rat. La vie Médicale, 30, 12-15.

KELLER, 1934.-

In HEGNAUER. Chemotaxinomie der Pflanzen. Ed. Birkhauser Verlag Basel und Stuttgart, 4, 342.

KERHARO J., 1970.-

Le Kinkeliba. PLantes médicinales et phytothérapie, 4, n° 1, 50.

KIRCHNER J.G., 1967.-

Thin-layer chromatography. In SPERRY E. et WEISS-BERGER A., *Technic of organic chemistry*. John Wiley et Sons, Ed., New-York and London, vol. XII, 436-437.

KRITCHEVSKY D. et KIRK M.R., 1952.-

Determination of Steroids in paper chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.*, 35, 346-351.

LAURENT J., 1969.-

L'évolution de la thérapeutique en France. Thèse Doct. Univ. Pharm., Nancy.

LECLERC H., 1966.-

Précis de Phytothérapie. Ed. Masson, Paris.

LIEUTAGHUI P., 1966.-

Livre des bonnes herbes. Ed. Robert Morel.

MAROS T., RACZ G., KATONAI B. et KOVACS V.V., 1966.-

Effets des extraits de *Cynara scolymus*, L., sur la régénération de foie de rat. *Arzneimittel-Forsch.*, Dtsch., 16, n° 2, 127-129.

MAZLIAK P., 1965.-

Analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides organiques végétaux. *Phytochemistry*, 4, 693-703.

MENTZER C., 1964, 1966, 1968.-

Actualités de Phytochimie Fondamentale. Ed. Masson, Paris, t I, II, III.

MERCK, 1960.-

Index, 17e Ed.

MICHAUD J. et MASQUELIER J., 1957.-

Les constituants polyphénoliques du *Cynara scolymus*. Etude du scolymoside. *Bull. Soc. Pharm.*, Bordeaux, 96, 103-105.

MICHAUD J. et MASQUELIER J., 1958.-

Essai d'identification du Cynaroside. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 97, 77-81.

MICHAUD J., 1964.-

Contribution à l'étude chimique et analytique de l'Artichaut (*Cynara scolymus* L.). Thèse Doct. Pharm., Bordeaux.

MONTVILLE F., 1933.-

Le *Cynara scolymus* L., (Artichaut cultivé) en thérapeutique. Thèse méd., Paris.

NELSON E.K. et MOTTERN H., 1931.-

Some organic acids in barberry, maize, oats and rye plants. J. Am. Chem. Soc., 53, 3046-3049.

PANIZZI L., SCARPATI M.L., 1954.-

Isolamento e costituzione del principio attivo del carciofo. Gass. Chim. Ital., 84, 806-815.

PARIS R.R. et MOYSE H., 1971.-

Précis de matière médicale. Ed. Masson et Cie, Paris, t III, 445-450.

PASSERA C., PEDROTI A., FERRARI G., 1964.-

Thin-layer chromatography of carboxylic acids and Keto acids of biological interest. J. Chrom., 14, 289-291.

PELT J.M. et LAURENT J., 1970.-

Produits et problèmes pharmaceutiques, t XXV, n° 9, 762-770.

PEPKOWITZ L.P., GILBERT S.G. et SHIVE J.W., 1944.-

The importance of oxygen in nutrient substrates for plants - organic acids. Soil. Sci., 58, 295-303.

PESEZ M., POIRIER P. et BARTOS J., 1966.-

Pratique de l'analyse organique colorimétrique. Ed.
Masson et Cie, Paris, 159.

PHARMACOPEE FRANCAISE, 1965.-

VIIIe édition.

PICARD R., 1935.-

Etude expérimentale et clinique d'un principe actif
cristallisé du *Cynara scolymus* L.. Thèse méd., Paris.

PREZIOSI P. et LOSCALZO B., 1956.-

L'Azione sulla colezesi, sul colesterolo ematico e
sulla lipoidosi colesterolica del principio attivo
del carciofo e di sostanze ad esso correlate. Fito-
terapia, 27, 666-672 et 690-698.

PREZIOSI P. et LOSCALZO B., 1957.-

Valutazione sperimentale dell' ac. 1,4 - dicaffeil-
chinico : cinarina quale principio attivo del carciofo
Archiv. Ital., sci., farm., 3e série, 7, 249-296.

PREZIOSI P., 1967.-

Farmacologia dei principi attivi del carciofo. Conv.
Int. Carcifo, 1967. BARI, BOZZE di stampa.

RANDERATH K., 1971.-

Chromatographie sur couches minces. Ed. Masson et
Cie, Paris, 259.

ROCHIETTA S., 1959.-

Storia farmaceutica - terapeutica del carciofo (*Cy-
nara scolymus* L.) dell' antichità e nel presente.
Minerva. farm. Ital., 8, 71-78.

ROSENTHAL R.W., SCHWARTZMAN L.H., GRECO M.P. et PROPER, 1963.-

Carboxylation of propargyl alcohols. J. Org. Chem.,
28, 2835-2838.

ROUSSELLET R. et PARIS R.R., 1971.-

Plantes médicinales et Phytothérapie, 5, n° 2,
159-170.

SCARPATI M.L., ORIENTE G., PANIZZI L., 1957.-

Sui costituenti caffeici nel carciofo. Ann. Chim.,
47, 150-154.

SCARPATI M.L., 1967.-

Chimica dei principi attivi del carciofo. Conv. Int.
Carciofo, 1967. BARI, BOZZE di stampa.

SCEMAMA M. et GARDE Ph., 1971.-

Evaluation et dosage de la Cynarine dans les extraits
d'Artichaut. PLantes médicinales et phyrothérapie, 5,
n° 1, 39-44.

SCHWEPPE H., 1959.-

In "Papier Chromatographie in der Botanik", Springer
Verlag, Heidelberg, 82.

SIEBERT G., 1963.-

Citrate and isocitrate determination with aconitase
and isocitric dehydrogenase. In BERGMAYER H.U.: Me-
thods of enzymatic analysis. Academic Press., Ed.
New-York and London, 340-345.

SNELL F.D. et SNELL C.T., 1961.-

Colorimetric methods of analysis. Ed. D. Van Nostrand
company, New-York, t III A, 331.

SOKOLOVA V.E., LYUBARTSEVA L.A. et VASILTCHENKO E.A., 1970.-

L'influence de l'Artichaut sur certains aspects du
métabolisme azoté chez les animaux (en russe). Far-
makologiya i Toksikologiya, 3, 340-343.

SUCHY M., HEROUT V. et SORM F., 1960.-

On terpenes. C VI. On hydrogenation products of cynaropicrin, the bitter principle of artichoke (*Cynara scolymus* L.). Coll. Czechoslov. Chem. Comm., 25, 507-514.

SUCHY M. HEROUT V. et SORM F., 1960.-

On terpenes. C XVI. Structure of cynaropicrin. Coll. Czechoslov. Chem. Comm., 25, 2777-2782.

STAHL E. et SCHORN P.J., 1961.-

Dünnschicht chromatographie. Hydrophiler Arzneipflanzenauszüge. VIII. Mitteilung : cumarine, Flavonderivate, hydroxysäuren, Gerbstoffe, Anthracenderivate und Flechteninhaltsstoffe. Z. Physiol. Chem., 263-274.

STAHL E., 1969.-

Thin-layer chromatography. Springer Verlag, Berlin, n° 175, 888.

SWAIN T., 1953.-

The identification of coumarins and related compounds by filter-paper chromatography. Biochem. J., 53, 200-208.

TIXIER L., 1939.-

Les actions physiologiques et thérapeutiques du *Cynara scolymus* L.. Presse médicale, 47, 880-883.

TIXIER L., 1961.-

Les indications de la Cynarathérapie consacrées par plus de 30 années d'expérimentation clinique. La semaine des hôpitaux, n° 8, 704-710.

TROUARD-RIOLLE, 1964.-

Les plantes médicinales. Ed. Flammarion, Paris.

VANLERENBERGUES J., GUERRIN F., BAR N. et BEL C., 1963.-

Secrétion de la bile par le foie de rat, action de
l'azide de sodium. C.r. Soc. Fran. Biol., 157, n° 7,
1454-1455.

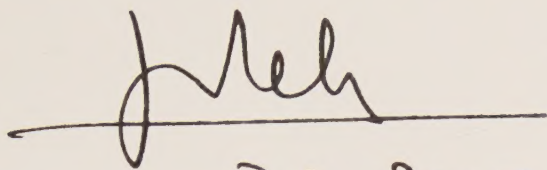
YOUNOS C., 1971.-

Etude des essences de quelques Labiées d'Afghanistan.
Thèse Doct. Pharm., Nancy.

VU,

NANCY, le 3 octobre 1972

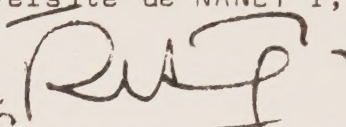
Le Président de Thèse,


J.N. PELT

VU et APPROUVE,
NANCY, le 8-10-72.

Le Directeur de l'U.E.R. des Sciences
pharmaceutiques et biologiques de
l'Université de NANCY I,




R. BENE

VU,

NANCY, le 9-10-72

Le Président de l'Université de NANCY I

